# Glykogenstoffwechsel in Anacystis nidulans
# In vivo und in vitro Experimente zur Regulation und Charakterisierung von Enzymen der α-Glucanverwertung

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
(Dr.rer.nat.)

vorgelegt dem Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

von

MARTIN LEHMANN

aus Haldensleben/Magdeburg

Marburg/Lahn 1978

Druck: Mauersberger, Marburg

# Glykogenstoffwechsel in Anacystis nidulans
# In vivo und in vitro Experimente zur Regulation und Charakterisierung von Enzymen der α-Glucanverwertung

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

von

MARTIN LEHMANN

aus Haldensleben/Magdeburg

Marburg/Lahn 1978

Druck: Mauersberger, Marburg

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Von dem Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg/Lahn
als Dissertation angenommen am: 24. 4. 1978
Tag der mündlichen Prüfung: 3. 5. 1978
Berichterstatter: Dozent Dr. G. Wöber
Mitberichterstatter: Prof. Dr. H. Follmann

Inhaltsverzeichnis


| | | Seite |
|---|---|---|
| 1. | Zusammenfassung | 1 |
| 2. | Liste der zitierten Enzyme | 5 |
| 3. | Einleitung | |
| 3.1. | Der Stamm Cyanophyta | 6 |
| 3.2. | Phototrophes und heterotrophes Wachstum | 7 |
| 3.3. | Glykogenstoffwechsel in phototrophen und heterotrophen Mikroorganismen | 8 |
| 3.4. | Enzyme und Enzymprodukte des α-Glucanabbaues | 10 |
| 3.5. | Hypothesen zum Mechanismus der Licht/Dunkel-Regulation | 12 |
| 3.6 | Wachstum von Mikroorganismen in kontinuierlicher Kultur | 15 |
| 4. | Zielsetzung | 17 |
| 5. | Methodik | |
| 5.1. | Chemikalien | 19 |
| 5.2. | Reinigung von Hilfsenzymen | 19 |
| 5.3. | Herstellung von Phosphorylase-Grenzdextrin | 20 |
| 5.4. | Herstellung radioaktiver Substanzen | |
| 5.4.1. | Herstellung von (U-$^{14}$C)-Glykogen | 21 |
| 5.4.2. | Herstellung von (U-$^{14}$C)-markierter Glucose, Maltose, Maltodextrine | 22 |
| 5.4.3. | Herstellung von (U-$^{14}$C)Phosphorylase-Grenzdextrin | 23 |
| 5.5. | Analytische Methoden | |
| 5.5.1. | Aktivitätsbestimmung von Hilfsenzymen | 24 |
| 5.5.2. | Aktivitätsbestimmung von Enzymen aus Anacystis nidulans | 24 |

Seite

5.5.3. Allgemeine Bestimmungsmethoden 28

5.6. Immobilisierte Enzyme für Affinitäts-chromatographie

5.6.1. Herstellung von Concanavalin A-Sepharose 30

5.6.2. Herstellung von immobilisierter α-Amylase 31

5.6.3. Herstellung von Butylsepharose 32

5.7. Kultivierung von Anacystis nidulans

5.7.1. Zusammensetzung des Mediums 32

5.7.2. Batch-Kulturen 32

5.7.3. Kontinuierliche Kultur (Chemostat) 33

5.7.4. Präparation von Sphäroplasten 34

6. Ergebnisse

6.1. Herstellung radioaktiver Substrate zur Charakterisierung von Enzymen in A. nidulans 35

6.1.1. Reinigung von (U-$^{14}$C)-Glykogen 36

6.1.2 Enzymatischer Abbau von (U-$^{14}$C)-Glykogen 37

6.2. Kontinuierliche Kultivierung von A. nidulans in einem Chemostaten unter substrat- und lichtlimitierenden Bedingungen 41

6.2.1. Wachstum und Nitratverwertung in Stickstoff-begrenzten Medien 43

6.2.2. Glykogengehalt der Zellen und Produktbildungsgeschwindigkeiten 47

6.2.3. Wachstum im Standardmedium 52

6.2.4. Übergang vom substrat- zum licht-limitierten Chemostaten 54

Seite

6.3. Charakterisierung von Enzymen des α-Glucanabbaues in A. nidulans

6.3.1. Enzymkombinationen für den Glykogenabbau in A. nidulans 57

6.3.2. Analyse der Reaktionsprodukte 58

6.4. Vorversuche zur Isolierung des Phosphorylase-Komplexes aus A. nidulans 66

6.4.1. Reinigung des Phosphorylase-Glykogen-Komplexes 67

6.4.2. Eigenschaften der gereinigten Phosphorylase 75

6.4.3. Experimente zur Trennung des Phosphorylase-Glykogen-Komplexes 78

6.5. Licht/Dunkel-Modulation der Glykogen-Phosphorylase 82

6.5.1. Phosphorylasespiegel in vivo während der Kultivierung in An- und Abwesenheit von Licht 82

6.5.2. Beeinflussung der Phosphorylaseaktivität durch Inhibitoren 86

6.5.3. Desaktivierung der Phosphorylase in vitro 90

7. Diskussion

7.1. Eine neue Methode zur Herstellung $^{14}C$-markierter Kohlenhydrate 98

7.2. Kultivierung von A. nidulans unter kontinuierlichen Bedingungen 99

7.3. Charakterisierung von Enzymen des α-Glucanabbaues - Vorschlag eines Stoffwechselschemas 101

Seite

7.4. Glykogen Phosphorylase - regulatorisches Enzym des α-Glucanabbaues in *A. nidulans* 106

8. Literaturzitate 111

## 1. Zusammenfassung

Der Glykogenabbau in Zellen von Anacystis nidulans wurde zum einen hinsichtlich der an der α-Glucanverwertung beteiligten Enzyme, zum andern in bezug auf die Regulation dieses Stoffwechselweges untersucht. Voraussetzung für die Charakterisierung von Enzymaktivitäten war die Bereitstellung geeigneter, radioaktiv markierter Substrate. Ausgehend von (U-$^{14}$C)-Glykogen, das aus Zellen von A. nidulans durch Affinitätschromatographie isoliert werden konnte, wurden folgende Substrate (nach Reinigung entsprechender Hilfsenzyme)hergestellt: (U-$^{14}$C)-Glucose, (U-$^{14}$C)-Maltose, (U-$^{14}$C)-Maltodextrine, (U-$^{14}$C)-ß-Amylase-Grenzdextrin, (U-$^{14}$C)-Phosphorylase-Grenzdextrin, (U-$^{14}$C)-Glucose-1-phosphat. Die Untersuchung der am Glykogenabbau in Anacystis beteiligten Enzyme erfolgte während der Glykogenmobilisierungsphase der Zellen (Kultivierung unter Lichtentzug) durch Inkubation mit $^{14}$C-markierten Substraten bekannter Struktur und durch Vergleich der Reaktionsprodukte mit den Produkten bekannter enzymatischer Reaktionen. Auf diese Weise konnte Glykogen-Phosphorylase, die in vivo als Enzym-Glykogen-Komplex vorlag und zwei hydrolytische Enzyme vom Typ eines debranching enzyme und einer α-Glucosidase identifiziert werden.

Eine teilweise Reinigung der beiden hydrolytischen Enzymaktivitäten konnte mit Hilfe von DEAE-Cellulose vorgenommen werden. Phosphorylase wurde als Glykogen-Enzym-Komplex durch DEAE-Cellulose und Affinitätschromatographie mit Concanavalin A-Sepharose bis zu einer spezifischen Aktivität von 48.3 U/mg gereinigt. Die Präparation war frei von amylolytischen Aktivi-

täten und ergab nach Solubilisierung des Enzyms mit SDS bei der Gelelektrophorese eine Proteinbande. Das Enzym konnte sowohl aus Zellen, die in vivo Glykogen abbauten (Kultivierung unter Lichtentzug) als auch unter Bedingungen der Glykogensynthese (Kultivierung in Gegenwart von Licht) isoliert werden. Dabei zeigte sich, je nach Vorbehandlung, ein unterschiedliches pH-Optimum der Reaktion in vitro. Für Phosphorylase aus Dunkelzellen wurde ein optimaler pH-Wert von 6.2, für belichtete Zellen von 5.5 bestimmt. Das Temperaturoptimum lag in beiden Fällen bei 40 °C.

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse kann ein Weg für den vollständigen Glykogenabbau in A. nidulans vorgeschlagen werden. Als erstes Enzym der katabolen Sequenz wird Glykogen Phosphorylase betrachtet, die in vivo als stabiler α-Glucan-Proteinkomplex vorliegt. Die Hydrolyse 1,6-α-glucosidischer Bindungen kann durch ein debranching enzyme katalysiert werden; verbleibende kurzkettige Maltodextrine werden als Substrate von einer α-Glucosidase akzeptiert.

Der Phosphorylase-Glykogen-Komplex war Ausgangspunkt für die Untersuchung der Regulation des Glykogenabbaues. Die Durchführung der Experimente erforderte physiologisch einheitliches Zellmaterial, das nach Konstruktion eines Chemostaten durch kontinuierliche Kultivierung des Organismus unter substratlimitierenden Bedingungen erhalten werden konnte. In der Chemostatkultur konnten darüberhinaus die Parameter für Wachstum und Glykogensynthese unter Substrat- und Licht-limitierenden Bedingungen ermittelt werden. Die Bestimmung der spezifischen Aktivität von Phosphorylase während der Glykogensynthese (Kultivierung im Stickstoff-freien Medium, Anwesenheit von Licht) ergab einen

konstanten Wert, unabhängig vom Glykogengehalt der Zellen. Entzug von Licht, das auslösende Signal für die Glykogenmobilisierung, führte zu einem zweifachen Anstieg der spezifischen Phosphorylaseaktivität. Die Aktivierung des Enzyms ließ sich durch Inhibitoren der Transkription und Translation (Rifampicin, Chloramphenicol) nicht hemmen. Durch Kontrollexperimente wurde sichergestellt, daß die Inhibitoren bei der Kultivierung im Dunkeln in die Zelle eindringen können (Blockierung des Einbaues von $^{3}$H-Leucin in Protein). Die Stimulation der Enzymaktivität erwies sich als reversibel: nach Aktivierung in Abwesenheit von Licht (Glykogenmobilisierung) folgte in Anwesenheit von Licht (Glykogensynthese) eine Desaktivierung der Phosphorylase. Die in vivo-Desaktivierung des Enzyms im Licht wurde durch Zugabe von DCMU zum Medium blockiert.

Eine Modulation der spezifischen Phosphorylaseaktivität ließ sich auch in vitro erreichen: Zellen wurden unter Lichtentzug kultiviert und in Sphäroplasten überführt; die Belichtung des Sphäroplastenlysats in einer hierfür speziell konstruierten Apparatur führte zu einer Desaktivierung der Phosphorylase. Der gleiche Effekt zeigt sich bei der Verwendung von DTT als Reduktionsmittel. Geht man hingegen von Zellen aus, die einer belichteten Kultur entstammten, so ergab eine Inkubation des Sphäroplastenlysats mit DTT keine signifikante Verminderung der Phosphorylaseaktivität. Um eine unspezifische Wirkung von Proteinasen auszuschließen, wurde die Aktivität von Isocitrat Dehydrogenase in An- und Abwesenheit von DTT bestimmt. Eine Beeinflussung dieses Enzyms durch DTT konnte nicht festgestellt werden.

Die Glykogen-Phosphorylase ließ sich auch nach etwa 200-facher Anreicherung aus Zellen, die unter Lichtentzug kultiviert worden waren, durch Inkubation mit DTT desaktivieren. Das Reduktionsmittel mußte dazu im Konzentrationsbereich bis 5 mM angewendet werden. Versuche, die Aktivität der gereinigten Phosphorylase in vitro durch physiologische Reduktions-/Oxidationsmittel (Thioredoxin aus Spinat, oxidiertes Glutathion) zu beeinflussen, ergaben keine signifikante Desaktivierung bzw. Stimulation des Enzyms.

Die Ergebnisse der in vivo und in vitro Experimente werden dahingehend interpretiert, daß Glykogen-Phosphorylase als regulatorisches Enzym des α-Glucanabbaues in A. nidulans betrachtet werden kann. Der Nachweis der Enzymaktivität während der Synthese von Glykogen in der Zelle ist durch die Existenz eines Turn-overs des Glykogenmoleküls plausibel. Als möglicher regulatorischer Mechanismus wird postuliert, daß der Abbau von Glykogen durch eine Überführung des Enzyms von einer wenig aktiven in eine aktive Form (chemische Modifikation) erfolgt, wobei eine direkte Beteiligung des photosynthetischen Elektronentransportes wahrscheinlich ist.

Die vorliegenden Ergebnisse lassen ein neues Prinzip regulatorischer Kontrolle für eine Phosphorylase erkennen. Außerdem ist damit erstmals bei einem photosynthetisierenden Organismus die Regulation des Polysaccharidabbaues auf enzymatischer Ebene gezeigt worden. Man darf hoffen, daß ein sehr ähnlicher Vorgang auch beim Abbau von Stärke in den Chloroplasten grüner Pflanzen verwirklicht ist.

2. Enzyme

α-Amylase oder 1,4-α-D-Glucan Glucanohydrolase,
EC 3.2.1.1

ß-Amylase oder 1,4-α-D-Glucan Maltohydrolase,
EC 3.2.1.2

Isoamylase oder Glykogen-6-Glucanohydrolase,
EC 3.2.1.68

Glucoamylase oder 1,4-α-D-Glucan Glucohydrolase,
EC 3.2.1.3

α-Glucosidase oder α-D-Glucosid Glucohydrolase,
EC 3.2.1.20

Glykogen Phosphorylase oder 1,4-α-D-Glucan: Orthophosphat
α-Glucosyltransferase, EC 2.4.1.1

Glucose Oxidase oder ß-D-Glucose: Sauerstoff-Oxidoreduktase,
EC 1.1.3.4

Peroxidase oder Donor: Wasserstoffperoxid-Oxidoreduktase,
EC 1.11.1.7

Lysozym oder Mucopeptid N-Acetylmuramylhydolase
EC 3.2.1.17

## 3. Einleitung

### 3.1. Der Stamm Cyanophyta

Anacystis nidulans, ein photoautotrophes, aerob wachsendes blau-grünes Bakterium, (auch Blaualge oder Cyanobakterium genannt), wird nach der systematischen Botanik[1] dem Stamm der Cyanophyta zugerechnet. Der Name betont den blauen Farbstoff Phycocyanin, der zusammen mit anderen Assimilationspigmenten in der Zelle vorkommt und dem Organismus oftmals eine blaugrüne Farbe verleiht. Cyanophyta nehmen in der Natur eine Mittelstellung zwischen Procaryoten und Eucaryoten ein. Mit den Pflanzen haben sie die Fähigkeit gemein, Lichtenergie zu verwerten und $CO_2$ zu assimilieren (photoautotrophes Wachstum), während in bezug auf die Zellorganisation Ähnlichkeiten mit Bakterien vorhanden sind[2].

Elektronenmikroskopische Aufnahmen belegen[3], daß das Kernmaterial nicht von einer Membran umgeben ist und daß Mitochondrien und Chloroplasten fehlen. Dafür erkennt man photosynthetische Lamellen, die als Vesikel oder Thylakoidstapel vorliegen können und die photosynthetisch aktiven Pigmente Chlorophyll a und ß-Carotin, sowie Phycocyanin und Phycoerythrin als akzessorischen Pigment, enthalten. Die beiden letztgenannten Farbstoffe liegen in vivo proteingebunden vor, und ihre Aufgabe besteht darin, Lichtenergie auf Chlorophyll zu übertragen. Die Analogie zur gram-negativen procaryotischen Zelle ist durch eine vielschichtige Zellwand gegeben[4], die ein Peptidoglycan (Mureinstützgerüst) enthält.

Man rechnet den Stamm der Cyanophyta gemeinhin zu den ältesten Organismen, die auf der Erde vorkommen, und vielfach werden in ihnen die evolutionären Vorläufer der Chloroplasten gesehen[2,4]. Ihr Vorkommen ist ubiquitär, die Vermehrung erfolgt durch binäre Spaltung.

3.2. Phototrophes und heterotrophes Wachstum

Die Fähigkeit zum photoautotrophen Wachstum ist allen Blaualgen gemein, während einige Arten, darunter auch Anacystis neben $CO_2$ auch organische Verbindungen (z.B. Glucose) aus dem Medium verwerten können[5]. Dabei werden aber grundsätzlich photosynthetische Reaktionen für die Bildung von Peduktionsmittel und ATP herangezogen. Die Notwendigkeit eines aktiven Transportes durch die Zellwand wurde gezeigt an Hand von Synechococcus 6301 und Aphanocapsa 6308[6]. Einige Arten (Chlorogloea, Nostoc u.a.) sind neben einem autotrophen Wachstum auch in der Lage, sich unter photo- und/oder chemoheterotrophen Bedingungen zu vermehren[7,8]. Photoheterotrophes Wachstum liegt beispielsweise in Gegenwart von Licht, DCMU (einem Inhibitor von Photosystem II) und einer Kohlenstoffquelle im Medium vor[9]. Dabei besteht für den Organismus die Möglichkeit, Lichtenergie via zyklische Photophosphorylierung zur Bildung von ATP zu verwenden, während als Kohlenstoffquelle nur ein Substrat des Mediums in Frage kommt, da eine Assimilierung von $CO_2$ verhindert ist. Unter chemoheterotrophen Bedingungen wächst der Organismus, wie alle anderen Bakterien, im Dunkeln auf einer organischen Kohlenstoffquelle.

3.3. Glykogenstoffwechsel in heterotrophen und phototrophen Mikroorganismen

Dem Abbau von Kohlenhydraten gilt in der Biochemie besonderes Interesse, da sie eine wichtige Rolle für den Energie- und Reservestoffwechsel der meisten Organismen spielen. Kohlenhydrate wie Stärke und Glykogen sind Polyglucosen, in denen Glucosemoleküle 1,4-α-glucosidisch zu linearen Ketten verknüpft sind, die ihrerseits wiederum über 1,6-α-glucosidische Bindungen verknüpft sind.

Die α-Glucansynthese erfolgt bei Bakterien vorwiegend während der stationären Wachstumsphase. Voraussetzung ist ein Überschuß einer verwertbaren Kohlenstoffquelle im Medium. Reguliert ist die ADP-Glucose-Pyrophosphorylase (ATP: α-D-Glucose-1-phosphat-Adenyl-Transferase, EC 2.7.7.27), die den AMP-Rest aus ATP auf Glucose-1-phosphat überträgt und allosterisch von Intermediaten der Glykolyse und von ATP aktiviert wird.

Die Glykogenakkumulierung bei Cyanophyta folgt im Prinzip dem bakteriellen Schema. Voraussetzung ist die Beendigung des Wachstums (z.B. durch Erschöpfen der Stickstoffquelle), sowie der Überschuß einer Kohlenstoffquelle ($CO_2$) im Licht[4,10]. Die Glykogensynthese in Anacystis wird begleitet vom Abbau des akzessorischen Pigments. Elektronenmikroskopische Aufnahmen[11], sowie die Isolierung des Polysaccharids aus Nostoc[12] ergaben, daß das α-Glucan in Form von Granulaten zwischen den photosynthetischen Lamellen liegt. Untersuchungen über die Feinstruktur des Glykogens aus Anacystis[13] zeigten eine Ähnlichkeit mit dem Glykogen aus Zuckermais und signifikante Unterschiede zu bakteriellen Glykogenen.

Die physiologischen Bedingungen, die zu einem Abbau des intrazellulär gespeicherten α-Glucans in Bakterien[14] führen, sind bei Clostridium pasteurianum untersucht[15,16]. Eine Mobilisierung findet statt, wenn der Organismus in einem Medium kultiviert wird, das keine verwertbare Kohlenstoff- und Energiequelle enthält. Als ein Enzym des Abbaues konnte eine Glykogen-Phosphorylase identifiziert werden, die lose an ihr Substrat gebunden war, in vitro durch ADP-Glucose und ATP aktiviert und von AMP inaktiviert wird.

Für A. nidulans wurden definierte Kulturbedingungen[17] ausgearbeitet, die zu einer Mobilisierung von Glykogen führen. Ein Abbau erfolgt: a) beim Entzug von Licht (fehlende Energiequelle), b) in Anwesenheit von Licht beim Entzug von $CO_2$ (fehlende Kohlenstoffquelle), c) in Anwesenheit von Licht, $CO_2$ und dem Herbizid DCMU (Blockierung der $CO_2$-Fixierung), d) in Anwesenheit von Licht und $CO_2$ nach Zusatz einer Stickstoffquelle zum Medium (Beginn von Wachstum auf Kosten des intrazellulären Glykogens). Aus diesen Befunden läßt sich schließen, daß Glykogen eine Reservekohlenstoffquelle ist. An Hand einer Mutante von A. nidulans, die die Fähigkeit, eine Dunkelperiode zu überleben, verloren hatte, konnte gezeigt werden, daß eine defekte Phosphorylase den beobachteten Phänotyp zum Teil verursachte[18].

Die Notwendigkeit eines regulatorischen Enzyms für den α-Glucanabbau ergibt sich aus der Feststellung eines Turn-overs für das Glykogenmolekül[17,19]. Damit ist ein ständiger Auf- und Abbau eines Moleküls nach vollendeter Synthese gemeint. Der Vorteil für die Zelle besteht darin, daß sie auf veränderte Stoffwechselbedingungen flexibler reagieren kann, da ständig sowohl

die Enzyme der Synthese wie des Abbaues vorhanden sind. Voraussetzung für die Wirksamkeit eines solchen Mechanismus ist allerdings eine strikte Regulierung der relativen Geschwindigkeiten von Auf- und Abbau. Für die bakterielle Glykogenmobilisierung ist das regulatorische Enzym bislang nicht bekannt.

### 3.4. Enzyme und Enzymprodukte des α-Glucanabbaues

Mikrobielle und pflanzliche Enzyme des Kohlenhydratabbaues zeichnen sich durch eine besondere Variationsbreite bezüglich der Spezifität und des Zusammenwirkens aus. In der Regel verfügen Mikroorganismen jedoch nicht über alle möglichen Kombinationen, sondern ihr Enzymsatz ist beschränkt auf die minimal Anzahl, die zum vollständigen Abbau von α-Glucanen nötig ist. Enzyme, die für den Abbau von verzweigten α-Glucanen verantwortlich sein können, sind mit ihren Substraten und Reaktionsprodukten in Fig.1 dargestellt.

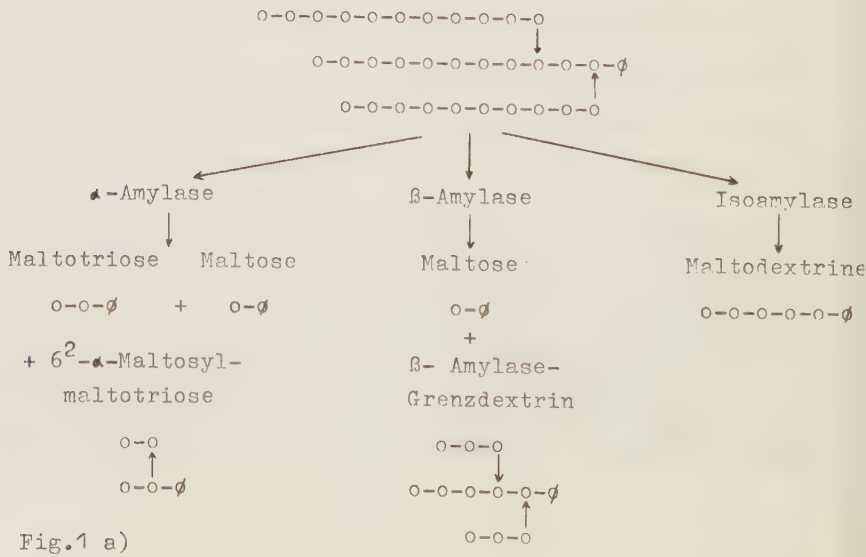


Fig.1 a)

Fig.1 a) Wirkungsweise von α-Amylase, ß-Amylase und Isoamylase

α-Amylase ist eine 1,4-α-Endohydrolase, d.h. sie spaltet 1,4-α-glucosidische Bindungen im Innern des Moleküls. 1,6-Bindungen werden nicht hydrolisiert, können aber umgangen werden.
ß-Amylase ist eine 1,4-α-Exohydrolase, die vom nicht-reduzierenden Ende her Maltose abspaltet. Als Produkt der Hydrolyse jeder zweiten 1,4-Bindung erscheint ß-Maltose. Das Enzym kann 1,6-α-Bindungen weder spalten noch umgehen.
Isoamylase spaltet ausschließlich 1,6-α-glucosidische Bindungen.

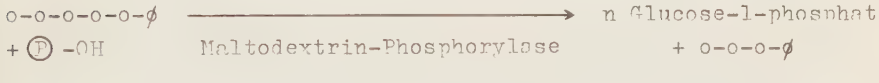


Fig.1 b) Wirkungsweise von Maltodextrin-Phosphorylase

Das Enzym überträgt schrittweise vom nicht-reduzierenden Ende her Glucosylreste auf anorganisches Phosphat. Es entsteht Glucose-1-phosphat und Maltotetraose.

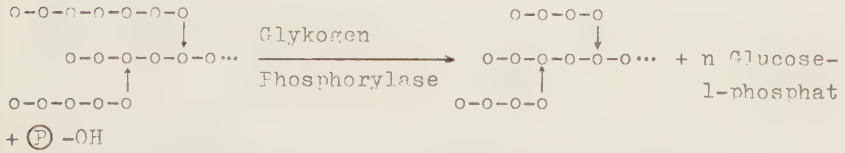


Fig.1 c) Wirkungsweise von Glykogen-Phosphorylase

Das Enzym überträgt schrittweise vom nicht-reduzierenden Ende her Glucosylreste auf anorganisches Phosphat. Phosphorylase kann 1,6-α-Bindungen weder spalten noch umgehen. Als Produkte entstehen Glucose-1-phosphat und ein Phosphorylase-Grenzdextrin, das nur noch Maltotetraose (4 Glucosylreste) vor jeder Verzweigung enthält.

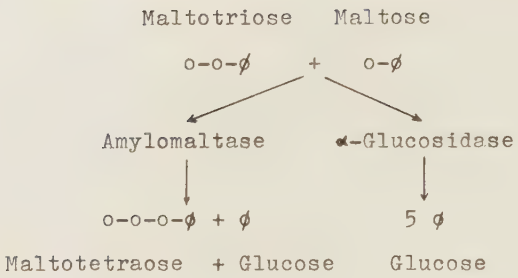


Fig.1 d) Wirkungsweise von Amylomaltase und α-Glucosidase

Amylomaltase katalysiert den Transfer einer Glucanosylgruppe z.B. des Maltosylrests aus Maltotriose auf ein Maltodextrin-Akzeptormolekül.
α-Glucosidase ist eine Exohydrolase, die vom nicht-reduzierenden Ende her 1,4-α-glucosidische Bindungen in Glucosiden wie Maltotriose, Maltose und Saccharose hydrolisiert.

Zeichenerklärung zu Fig.1: o, Glucosylrest; ø, reduzierendes Ende; o-o, 1,4-α-glucosidische Bindung; o→o, 1,6-α-glucosidische Bindung.

## 3.5. Hypothesen zum Mechanismus der Licht/Dunkel-Regulation bei phototrophen Organismen

Eine phototrophe Ernährung setzt eine lichtabhängige ET-Kette voraus, die in der Lage ist, den Organismus mit chemischer Energie (ATP) und Reduktionsäquivalenten (NADPH) zu versorgen. Die assimilatorische $CO_2$-Reduktion erfolgt in einem Kreisprozeß (reduktiver Hexosephosphat/Pentosephosphat-Zyklus, HP-PP-Zyklus), der aus einer carboxylierenden, reduzierenden und regenerierenden Phase besteht. Als Nettoprodukt erscheint

Triosphosphat, das zum Aufbau des Assimilatspeichers (Stärke oder Glykogen) oder zur Versorgung der Zelle mit reduzierten C-Verbindungen dient. Im Dunkeln wird das gespeicherte Assimilat abgebaut und über den oxidativen HP-PP-Zyklus verarbeitet. Dem oxidativen und reduktiven HP-PP-Zyklus sind eine Reihe von Enzymen gemeinsam; darüberhinaus gibt es für jeden Zyklus einige typische, z.T. regulierte Enzyme.

Derzeit werden zwei Modelle diskutiert, die eine Aktivierung oder Desaktivierung von Schlüsselenzymen des HP-PP-Zyklus bei Licht/Dunkel-Regulation erklären. Nach dem ersten Modell[20,21] erfolgt eine Modulation durch eine Verschiebung der $H^+$- und $Mg^{++}$-Ionenkonzentrationen, die durch Licht in den Kompartimenten des Chloroplasten ausgelöst wird. Die Zusammenhänge sind in Fig.2 a dargestellt. Als Folge der Belichtung erhöht sich die Konzentration von $Mg^{++}$ im Stroma, der pH-Wert steigt. Schlüsselenzyme des reduktiven HP-PP-Zyklus werden im Licht durch Magnesiumionen und alkalischen pH-Wert aktiviert, bzw. im Dunkeln durch Absinken der $Mg^{++}$-Ionenkonzentration und des pH-Wertes desaktiviert.

Das zweite Modell[22,23] postuliert eine direkte, lichtabhängige Modulation von Enzymaktivitäten durch Redoxprozesse in der Form, daß einige Schlüsselenzyme der Photoassimilierung im Licht reduziert und im Dunkeln oxidiert werden. Wahrscheinlich sind hierfür Übergänge zwischen Disulfidbrücken und -SH-Gruppen im Enzym verantwortlich. Fig.2 b zeigt schematisch den möglichen Mechanismus. Die entscheidende regulatorische Funktion solcher Redoxübergänge besteht darin, daß sich oxidierte und reduzierte Spezies eines Enzyms in der Aktivität unterscheiden. Zusammen-

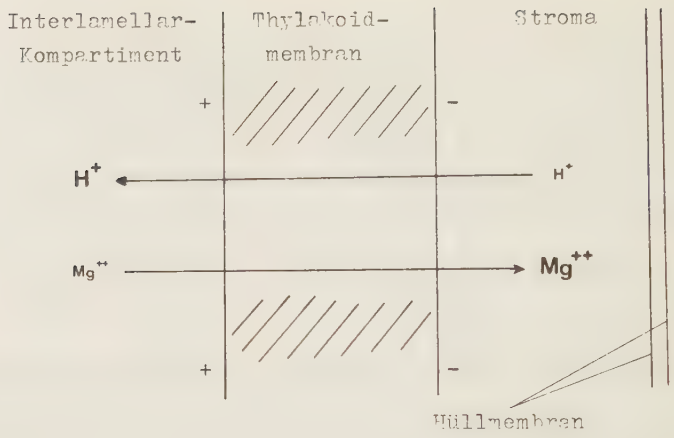


Fig.2 a) Auswirkung von Licht auf Vorgänge im Chloroplasten

Die photosynthetischen Pigmente und die Elektronentransportkette sind in der Thylakoidmembran lokalisiert. Der lichtgetriebene Elektronentransport bewirkt die Ausbildung eines Membranpotentials und als weitere Folge den Transport von Protonen vom Stroma in den Interlamellarraum. Der pH-Wert im Stroma steigt und $Mg^{2+}$ wandert als Gegenion.

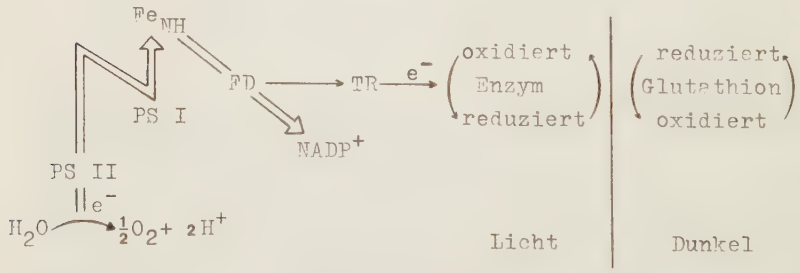


Fig.2 b) Möglicher Mechanismus für die lichtabhängige Regulation von Chloroplastenenzymen.

Im Licht werden Elektronen von Chlorophyll auf Ferredoxin (FD) und weiter über ein spezifisches Reduktasesystem auf Thioredoxin (TR) übertragen. Reduziertes Thioredoxin seinerseits reduziert (aktiviert) regulatorische Enzyme des Chloroplasten. Im Dunkeln werden die aktiven Enzyme mit Hilfe von oxidiertem Glutathion oxidiert (desaktiviert).

gefaßt läßt sich nach diesem Modell die Regulation als chemische Modifikation von Enzymen durch Redoxprozesse verstehen.

### 3.6. Wachstum von Mikroorganismen in kontinuierlicher Kultur

Kontinuierliche Kultivierungssysteme[24,25] werden verwendet, zur Untersuchung von Wachstum und Stoffwechsel von Mikroorganismen. Stationäre oder batch-Kulturen haben demgegenüber den Nachteil, daß das Wachstum der Zellen verschiedenen Phasen unterliegt, denen unterschiedliche Stoffwechselsituationen entsprechen. Zwangsläufig häufen sich während der Kultivierung auch Stoffwechselprodukte des Organismus im Medium an und schaffen physiologisch heterogene Bedingungen. Diese Nachteile werden vermieden, indem der Kultur laufend frisches Medium zugefügt und mit der gleichen Geschwindigkeit Zellsuspension entnommen wird. Das Medium enthält eine das Wachstum begrenzende Komponente, die, bei vorgegebener Pumpgeschwindigkeit, nur eine bestimmte Wachstumsgeschwindigkeit zuläßt. Im Chemostatgefäß bildet sich deshalb ein stationäres Fließgleichgewicht aus (steady state). Für diesen Fall ergibt sich der Zusammenhang zwischen Volumenwechsel (D), spezifischer Wachstumsgeschwindigkeit ($\mu$) und der Verdopplungszeit ($t_d$) aus folgender Gleichung:

$$D = \mu = \mu_{max} \frac{s}{K_s + s} = \frac{\ln 2}{t_d}$$

wobei s die Konzentration der das Wachstum begrenzenden Komponente und $K_s$ gleich der Substratkonzentration bei 0.5 $\mu_{max}$ ist. Ein Auswaschen der Kultur erfolgt, wenn $D > \mu_{max}$ wird.

Bei der kontinuierlichen Kultivierung phototropher Organismen ist $\mu$ auch eine Funktion der Lichtintensität ($\mu_i$). Man erhält deshalb bei Zufuhr von Medium, das keine begrenzende Komponente enthält ebenfalls ein steady state, dessen Zellkonzentration von der Lichtintensität und von der Schichtdicke der Kultur abhängt. Das steady state ist stabil unter Lichtlimitierenden Bedingungen, wenn $D < \mu_{max,i}$. Für Substratbegrenzung gelten die Randbedingungen obiger Gleichung.

## 4. Zielsetzung

Ausgangspunkte der Arbeit waren folgende physiologische Befunde:

1. Eine Akkumulierung von Glykogen findet in Anacystis nidulans statt, wenn die Zellteilung beendet ist (stationäre Wachstumsphase) und ein Überschuß an $CO_2$ vorhanden ist. Weitere Voraussetzung ist die Anwesenheit von Licht und Sauerstoff (photoautotrophe Kulturbedingungen).

2. Eine nahezu vollständige Mobilisierung der Glykogenreserve wird beobachtet, wenn der Organismus unter Hungerbedingungen (z.B. fehlendes Licht oder die Anwesenheit von DCMU im Medium) kultiviert wird. Das Glykogen stellt eine Reservekohlenstoffquelle für die Zelle dar.

3. Die Existenz eines Turn-overs des Glykogenmoleküls zeigt, daß die Geschwindigkeiten der Glykogensynthese und des Abbaues fein reguliert sein müssen.

Ausgehend von diesen Befunden sollten die am Abbau von Glykogen beteiligten Enzyme identifiziert, sowie deren Regulation näher untersucht werden. Wegen der Analogie zum bakteriellen Glykogenstoffwechsel, die sich an Hand der physiologischen Befunde bei Anacystis zeigte, konnte vermutet werden, daß es sich bei den Enzymen des $\alpha$-Glucanabbaues vom Prinzip her um bekannte und bei anderen (heterotroph wachsenden) Mikroorganismen schon nachgewiesene Aktivitäten handelt.

In der Literatur war eine Phosphorylaseaktivität in Zellhomogenaten von Synechococcus 6301 beschrieben[6]. Dieses Enzym konnte

auch in A. nidulans, Stamm 1402-1, leicht nachgewiesen werden.

Da Phosphorylase allein nicht den vollständigen Glykogenabbau in vivo katalysieren kann, muß der Organismus notwendigerweise über weitere Enzyme verfügen, die in der Lage sind, 1,4-α- und 1,6-α-Bindungen zu spalten. Für eine Identifizierung dieser Aktivitäten sollten Substrate bekannter Struktur vorgegeben und durch Analyse der Reaktionsprodukte auf den Typus des Enzyms geschlossen werden. Von den in Frage kommenden Aktivitäten bereitete insbesondere das vermutete debranching enzyme Schwierigkeiten bei der Identifizierung, da für eine Aktivitätsbestimmung kein geeignetes Substrat zur Verfügung stand. Um eine Analyse der Reaktionsprodukte vornehmen zu können, mußte deshalb (neben der Reinigung von Hilfsenzymen) dieses Substrat hergestellt werden.

Die Frage nach der Regulation des Glykogenabbaues in Anacystis wurde auf zwei Ebenen gestellt. Zum einen galt es von den Enzymen der katabolen Sequenz dasjenige aufzufinden, das den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt des Abbaues katalysiert, zum anderen sollte an Hand von zwei Modellvorstellungen geklärt werden, welches biochemische Signal für die Umschaltung von Glykogenakkumulierung auf Mobilisierung beim Licht/Dunkel-Wechsel verantwortlich ist. Für die Durchführung der Experimente war die Bereitstellung von Zellen mit einem definierten Glykogengehalt notwendig. Anacystis sollte deshalb unter den Bedingungen der Substrat-limitierten kontinuierlichen Kultur gezüchtet werden, wobei die bekannten Kulturparameter, die zu einer Glykogensynthese in batch-Kulturen führen, auf den Chemostatbetrieb zu übertragen waren.

## 5. Methodik

### 5.1. Chemikalien

Kohlenhydrate, die als Substrate in Enzymtests oder für analytische Zwecke verwendet wurden, lieferten folgende Firmen: lösliche Stärke, Maltose, Glucose, Glucose-1-phosphat, Saccharose, p-Nitrophenyl-α-D-glucopyranosid von Merck, Darmstadt; Methyl-α-D-glucopyranosid, Austernglykogen Typ II von Sigma, St. Louis, USA; eine Maltodextrin-Mischung (Cl ≈ 7) von Corn Products Int., USA; Phytoglykogen wurde aus Süßmais isoliert[26].

DTT (1,4-Dithiothreit), Promcyan, Acetonitril waren Produkte der Fa. Merck, Darmstadt; EDTA, SDS lieferten Serva, Heidelberg; oxidiertes Glutathion Boehringer, Mannheim. Sepharose 4B wurde von Pharmacia, Frankfurt, DEAE-Cellulose von Whatman, Maidstone, U.K. und L-Leucin von Bayer, Leverkusen, bezogen. Thioredoxin aus Spinat war ein Geschenk von Dr. B. Buchanan, Berkley, USA. Alle in der Arbeit verwendeten radioaktiven Verbindungen wurden selbst hergestellt mit Ausnahme von $NaH^{14}CO_3$ (spezifische Radioaktivität: 58.5 mCi/mMol), (U-$^{14}$C)-Glucose-1-phosphat (312 mCi/mMol) und $^{3}$H-Leucin (1 mCi/mMol), die das Radiochemical Centre Amersham, U.K. lieferte.

### 5.2. Reinigung von Hilfsenzymen

Glucoamylase (spezifische Aktivität: 100 IU/mg) wurde aus einem technischen Produkt (Diazyme, Miles Labs., USA) zu annähernder Homogenität durch wiederholte Chromatographie (DEAE-Cellulose) gereinigt[27]. ß-Amylase konnte aus Süßkartoffeln isoliert werden[28], zur Entfernung von Verunreinigungen

an α-Glucosidase wurde eine Methode nach Marshall und Whelan verwendet[29]. Cytophaga Isoamylase (spezifische Aktivität: 50 IU/mg) wurde von British Drug House, Poole, Dorset, U.K. bezogen und nach Gunja-Smith et al.[30] behandelt. Das gereinigte Enzym enthielt keine endo-1,4-α-D-Glucanase-Aktivität beim Test mit oxidierter Amylose[31]. α-Amylase (spezifische Aktivität 220 IU/mg) wurde aus 300 ml menschlichem Speichel nach Fischer und Stein gereinigt[32]. Concanavalin A wurde aus jack bean meal (Sigma) mit 0.15 M NaCl extrahiert und durch Chromatographie (Sephadex G 50) gereinigt[33]. Phosphorylase b (spezifische Aktivität: 30 IU/mg) konnte nach Fischer und Krebs[34] aus den Hinterläufen eines Feldhasen, der zufällig auf der Straße gefunden wurde, isoliert werden. Zur Entfernung letzter Spuren von debranching enzyme wurde eine hydrophobe Chromatographie (Aminobutyl-Sepharose) nach Cohen[35] durchgeführt.

Ein α-Amylase Inhibitor aus Phaseolus vulgaris (spezifische Aktivität: 2,4 µg hemmen 1 IU α-Amylase) wurde freundlicherweise von Herrn K.-H. Pick zur Verfügung gestellt. Immobilisierte Glucoamylase (spezifische Aktivität 100 IU/g), Glucose-Oxidase (grade III, 12 IU/mg und Peroxidase (grade II, 100 IU/m waren Produkte der Fa. Boehringer, Mannheim. Lysozym aus Eiweiß (spezifische Aktivität 22000 IU/mg) lieferte Serva, Heidel berg.

5.3. Herstellung von Phosphorylase-Grenzdextrin

Das Substrat wurde aus Austernglykogen durch erschöpfende Behandlung mit Glykogen-Phosphorylase folgendermaßen gewonnen[35]

5 g Glykogen wurden in 100 ml 50 mM Natriumphosphatpuffer pH 6.8 gelöst, 0.1 mM AMP und 20 IU Phosphorylase b (0.1 ml) hinzugegeben und die Reaktionsmischung 23 h gegen 2 l des gleichen Phosphat/AMP-Puffers dialysiert. Danach erfolgte erneute Zugabe von 2 IU Phosphorylase (10 µl) mit anschließender Dialyse gegen Phosphat/AMP-Puffer (5 h) und Wasser (15 h). Der Inhalt des Dialyseschlauches wurde kurz aufgekocht, zentrifugiert (10 min, 10000g) und lyophilisiert. Die Ausbeute betrug 3 g.
Zur Kontrolle wurden 2 mg Grenzdextrin mit einem Überschuß an Isoamylase 5 h unter aseptischen Bedingungen inkubiert, die Reaktionsprodukte papierchromatographisch getrennt (n-Butanol:Pyridin:Wasser, 10:3:3, v/v/v, mehrfach aufsteigend[36]) und entwickelt. Die Analyse ergab nur die für ein Phosphorylase-Grenzdextrin typischen Maltodextrine mit einer Kettenlänge $\geq 4$.

## 5.4. Herstellung radioaktiver Substanzen

### 5.4.1. Herstellung von (U-$^{14}$C)-Glykogen

Die Isolierung erfolgte aus glykogenhaltigen Zellen von A. nidulans. Der Organismus wurde in einem Stickstoff-defizienten Medium (0.1 g $KNO_3$/l) als batch-Kultur photoautotroph kultiviert, bis die Glykogenakkumulierungsphase erreicht war (50 h). Nach Überführung von 100 ml Kultur (40 mg Trockengewicht) in einen sterilen 500 ml Erlenmeyerkolben erfolgte die Zugabe von 0.2 ml einer wässrigen $NaH^{14}CO_3$-Lösung (spez.

Radioaktivität: 58.5 mCi/mMol). Die Zellen wurden kontinuierlich belichtet (2000 lux) und bei Zimmertemperatur 24-36 h geschüttelt. Zur Präparation von Sphäroplasten wurden 10 ml Sorbit-Lösung (vgl. 5.7.4.) zugesetzt, nach 1.5 h zentrifugiert (1 min, 1000 g) und durch Zugabe von Wasser (3 ml), 0.1 M Natriumacetat-Puffer pH 5.0 (2 ml) unter heftigem Schütteln lysiert. Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation entfernt (10 min, 10000g). Das Sphäroplastenlysat wurde über eine DEAE-Cellulose-Säule (2 ml) äquilibriert in 50 mM Natriumacetat-Puffer gegeben, und (U-$^{14}$C)-Glykogen mit 6 ml Puffer eluiert. Nach Zugabe von Concanavalin A-Sepharose (0.5 g) und 1 mM $CaCl_2$, 1 mM $MnCl_2$ wurde 5 h bei Zimmertemperatur geschüttelt, in eine Pasteurpipette gefüllt, mit 5 ml 1M NaCl gewaschen und Glykogen mit 0.1 M Saccharose eluiert (10 ml). Anschließend wurde das Eluat dialysiert (Wasser, 15 h) und lyophilisiert. Der Reinheitsgrad des isolierten Glykogens ließ sich durch Inkubation mit einem Überschuß an Glucoamylase und D-Glucose-Oxidase bestimmen. $^{14}$C-markierte D-Gluconsäure wurde im Anschluß über einen Anionentauscher abgetrennt, und das Eluat auf Radioaktivität getestet. Mit dieser Methode ergab sich, daß mehr als 95 % des Glykogens aus $^{14}$C-markierter Polyglucose bestanden.

5.4.2. Herstellung von (U-$^{14}$C)-markierter Glucose, Maltose, Maltodextrine

Lösungen von (U-$^{14}$C)-Glykogen und 2 mg Phytoglykogen als Träger wurden in 10 mM Natriumacetat Puffer, pH 5.0, unter aseptischen Bedingungen mit einem Überschuß an Isoamylase

((U-$^{14}$C)-Maltose), ß-Amylase ($^{14}$C-markiertes ß-Amylase-Grenzdextrin und Maltose) und Glucoamylase ((U-$^{14}$C)-Glucose) inkubiert. Die Proben mit ß-Amylase enthielten 5 mM 2-Merkaptoäthanol und Serumalbumin (1 mg/ml). Die Reaktionsprodukte jeder Inkubation wurden papierchromatographisch getrennt (n-Butanol:Pyridin:Wasser, 6:4:3, v/v/v, mehrfach aufsteigend), und die Radioaktivität auf dem Papier analysiert. Die Identifizierung erfolgte an Hand einer cochromatographierten Maltodextrin-Mischung, die nach Besprühen mit Glucoamylase mit dem $AgNO_3$/NaOH/$Na_2S_2O_3$-Reagenz[37] entwickelt wurde.

5.4.3. Herstellung von (U-$^{14}$C)-Phosphorylase-Grenzdextrin

Ausgehend von 150 ml Anacystis-Kultur, die in Gegenwart von $^{14}CO_2$ Glykogen akkumuliert hatte, wurde (U-$^{14}$C)-Glykogen analog 5.4.1. isoliert. Zu einer Lösung (10 ml, 100 mM Natriumphosphat-Puffer, pH 6.5), die $^{14}$C-markiertes Glykogen und 100 mg Austernglykogen als Träger enthielten, wurden 2 IU Phosphorylase und 1 mM AMP zugesetzt. Die Reaktionsmischung wurde 5 h bei 35 °C gegen Phosphat/0.1 mM AMP-Puffer dialysiert. Danach erfolgte die Zugabe von 0.2 IU Phosphorylase und eine weitere Dialyse gegen den gleichen Puffer für 2 h. Der Inhalt des Dialyseschlauches wurde aufgekocht, über Nacht gegen Wasser dialysiert und lyophilisiert. Die Ausbeute betrug 65 mg Grenzdextrin.
Zur Kontrolle wurde ein Aliquot mit einem Überschuß an Isoamylase inkubiert und die Reaktionsprodukte papierchromatographisch getrennt. Die Analyse ergab nur Maltodextrine mit einer Kettenlänge $\geq 4$.

## 5.5. Analytische Methoden

### 5.5.1. Aktivitätsbestimmung von Hilfsenzymen

Die Aktivität von α-Amylase und ß-Amylase, Isoamylase und Glucoamylase[27,28,38,39] wurde mit Amylose und löslicher Stärke als den entsprechenden Substraten bestimmt. Der Testansatz enthielt 0.2 ml Substratlösung (10 mg/ml), 0.1-0.2 ml Enzymlösung, Tris-Maleat-Puffer, pH 6.2 (α-Amylase), pH 5.5 (Isoamylase), pH 5.0 (Glucoamylase) zu 1 ml. Die Inkubationszeit betrug 30 min bei 35 °C. Die Aktivität wurde als Freisetzung reduzierender Endgruppen nach Nelson[40] bestimmt.

Phosphorylase aus Kaninchenmuskel ließ sich in Syntheserichtung[41] durch Bestimmung der aus Glucose-1-phosphat freigesetzten Menge Phosphat messen. 0.05 ml Enzymlösung wurden mit 0.2 ml einer 4 % (w/v) Glykogenlösung in Tris/HCl-Puffer pH 6.8 und 0.2 ml einer 4 mM AMP-Lösung 15 min. bei 35 °C vorinkubiert. Der Start der Peaktion erfolgte durch Zugabe von 0.2 ml Glucose-1-phosphat (10 mg/ml) und 0.35 ml Puffer. Nach 5, 10, 15 min. wurden 0.2 ml der Inkubationsmischung entnommen, 3 ml 36 mM $H_2SO_4$ und 3 ml Ammoniummolybdad/Eisen(II)sulfat-Lösung (1 g Ammoniummolybdad, 3.2 ml konzentrierte $H_2SO_4$, 4 g $FeSO_4$ in 100 ml $H_2O$) zugesetzt, und nach 5 min. die Extinktion bei 710 nm gemessen.

### 5.5.2. Aktivitätsbestimmung von Enzymen aus A. nidulans

Zur Bestimmung von α-Glucosidase wurde p-Nitrophenyl-α-D-Glucopyranosid als Substrat verwendet. Der Testansatz enthielt 0.2 ml Substratlösung (5 mg/ml), 0.5 ml Enzymlösung und 0.5 ml 100 mM

Natriumacetat-Puffer, pH 5.0. Nach der Inkubation (0.5-2 h, 35 °C) wurden 4 ml 0.1 M $Na_2CO_3$-Lösung zugegeben, wodurch sich ein pH-Wert von 10 ergibt, und das gebildete p-Nitrophenolat bei 400 nm gemessen. Eine Eichkurve ließ sich mit mehrfach umkristallisiertem p-Nitrophenol aufstellen. Wegen des Chlorophyllgehaltes der Enzymlösung wurde zu jedem Test ein Blindwert durch Behandlung einer Probe bei 100 °C (3 min.) erstellt. Trat dabei eine Trübung auf, wurde zentrifugiert (3 min., 5000 g) und der klare Überstand vermessen; in diesem Fall wurde die entsprechende Probe zur Aktivitätsbestimmung auf die gleiche Weise behandelt.

Zur Bestimmung amylolytischer Aktivitäten wurden Glykogen oder Phosphorylase-Grenzdextrin als Substrat verwendet. Der Testansatz enthielt 0.2 ml Substratlösung (10 mg/ml in 200 mM Tris-Maleat, pH 6.8), 0.5 ml Enzymlösung und 0.3 ml des gleichen Puffers. Nach der Inkubation (0.5-2 h) wurde eine Bestimmung reduzierender Endgruppen nach Nelson durchgeführt. Die Ermittlung des Blindwertes erfolgte analog der Bestimmung von α-Glucosidase.

Die Analyse von Reaktionsprodukten ließ sich durch Inkubation mit (U-$^{14}$C)-Glykogen und (U-$^{14}$C)-Phosphorylase-Grenzdextrin durchführen. Der Testansatz enthielt 0.2 ml Substratlösung (10 mg/ml, $1.9 \times 10^5$ dpm), 0.5 ml Enzymlösung und 0.3 ml Tris-Maleat-Puffer, pH 6.8. Die Inkubationszeit betrug 2 h bei 35 °C. Anschließend wurden die Proben (Sphäroplastenlysat) 3 min. bei 100 °C behandelt, zentrifugiert (3 min, 5000 g) und der Überstand am Rotavapor auf 0.1 ml eingeengt. Testansätze mit dem DEAE-Cellulose-Eluat wurden nach der Inkubation zur Entsalzung über eine Biogel P 2-Säule (2 ml) gegeben und eingeengt.

Die Trennung von Reaktionsprodukten erfolgte papierchromatographisch mit n-Butanol:Pyridin:Wasser (6:4:3, v/v/v, mehrfach aufsteigend) als Laufmittel. Zur Identifizierung wurde eine (U-$^{14}$C)-Maltodextrin-Mischung co-chromatographiert. Proben, in denen man Glucose-1-phosphat als Abbauprodukt vermutete, wurden als Doppelbestimmungen durchgeführt und ein Teil einer Nachinkubation (10 min., 35 °C) mit alkalischer Phosphatase in Gegenwart von 5 mM $MgCl_2$ unterzogen. $^{14}$C-Glucose-1-phosphat ließ sich durch Vergleich mit der Kontrolle als $^{14}$C-Glucose bestimmen. Die Ermittlung radioaktiver Produkte auf Papierchromatogrammen erfolgte mit dem Packard Radiochromatogramm Scanner (Zählausbeute für $^{14}$C ≈ 15 %).

Die Bestimmung von Phosphorylase ließ sich im Sphäroplastenlysat wegen des Anteils gefärbter Substanzen nur mit einem radiochemischen Test durchführen[42]. Der Ansatz umfaßt 0.5 ml Lysat, 0.1 ml (U-$^{14}$C)-Glucose-1-phosphat-Lösung (1 mg, $4x10^5$ dpm) und 0.4 ml 50 mM Tris-Maleat-Puffer pH 6.2. Im Sphäroplastenlysat konnte auf Glykogen als Primer verzichtet werden, da ausreichende Mengen vorhanden waren. Andernfalls wurden 0.05 ml einer 4 % (w/v) Glykogenlösung eingesetzt. Die Inkubationszeit betrug 15-30 min. bei 35 °C. Anschließend wurde das gebildete (U-$^{14}$C)-Glykogen von nicht umgesetzten Substrat auf einer Anionenaustauschersäule (2 ml, Pasteurpipette), gefüllt mit DOWEX 1x4, 100-200 mesh, $Cl^-$-Form, abgetrennt. Der Ionentauscher war zuvor mit 3 mg Glykogen äquilibriert worden. Die Elution erfolgte mit 3 ml Wasser, und 0.2-0.5 ml des Eluates wurden direkt durch Flüssigkeitsszintillation gezählt. Die Menge des Eluates wurde so gewählt,

daß bei der Radioaktivitätsmessung das externe Standardkanalverhältnis trotz Farbquench größer als 0.5 war. Die Bestimmung der Säulenkapazität erfolgte mit einer gleichbehandelten Aninonentauschersäule, auf die D-(U-$^{14}$C)-Glucose-1-phosphat ohne Enzym aufgetragen worden war.

Mit fortschreitender Reinigung konnte die Phosphorylaseaktivität mit dem unter 5.5.1. beschriebenen colorimetrischen Test ermittelt werden. 0.1-0.2 ml Enzymlösung wurden dazu mit 0.05 ml Glucose-1-phosphat (50 mg/ml), ergänzt mit 50 mM Tris-Maleat-Puffer pH 6.2 zu 0.5 ml, 30 min. bei 35 °C inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 3 ml 36 mM $H_2SO_4$ und 3 ml Ammoniummolybdad/$FeSO_4$-Lösung (vgl. 5.5.1). Nach 5 min. wurde die Extinktion bei 710 nm gemessen.

NADP-abhängige Isocitrat Dehydrogenase (EC 1.1.1.42) ließ sich nach Cleland et al.[43] bestimmen. 100 ml Chemostatkultur wurden auf 5 ml reduziert, durch Ultraschall (Branson sonifier, 30 % rel. output, 20 sec. bei 0 °C) homogenisiert und zentrifugiert (5 min, 10000 g). Der Testansatz enthielt 0.1 M Imidazolpuffer, pH 8.0 (1.25 ml), 10 mM $MgCl_2$-Lösung (0.05 ml), 0.05 ml NADP-Lösung (11 mg/ml), 0.05 ml D,L-Isocitrat-Lösung (8 mg/ml Imidazolpuffer), 10 mM DTT oder $H_2O$ (0.05 ml) und 0.05 ml Enzymlösung. Die Reaktion wurde durch Messen der Extinktion bei 340 nm verfolgt. Die Bestimmung des Blindwertes erfolgte bei gleicher Zusammensetzung der Probe in Abwesenheit von NADP. Enthielt der Testansatz DTT, wurde 10 min, bei 0 °C ohne NADP vorinkubiert.

5.5.3 Allgemeine Bestimmungsmethoden

Der Chlorophyllgehalt von Zellen ließ sich durch Extraktion Mit Aceton/0.05 N $NH_3$ und Messung der Extinktion bei 650 und 665 nm ermitteln[44]. Eine Bestimmung ist in batch-Kulturen zu Beginn der stationären Wachstumsphase nicht möglich, da der Chromophor der Phycobiline zu diesem Zeitpunkt in Aceton löslich ist.

Das Trockengewicht von Zellen wurde routinemäßig nach der Methode des packed cell volume (PCV) bestimmt. 2-5 ml Kultur wurden dazu in kalibrierten Kapillargläsern zentrifugiert (10 min, 1000 g) und das PCV an Hand einer Eichkurve mit dem direkt ermittelten Trockengewicht korreliert[45] (Präzipitation von 2-5 ml Zellsuspension auf Milliporefilter). Für den Betrieb des 1 l Chemostaten (glykogenhaltige Zellen) galten folgende Umrechnungen: 2 ml Kultur ≙ 4 µl PCV ≙ 9.4 µg Chlorophyll ≙ 1.5 mg Trockengewicht.

Der Nitratgehalt des Kulturmediums ließ sich mit der Phenoldisulfonsäure Methode (1-Hydroxybenzol-2,4-disulfonsäure) nach Taras[46] bestimmen. Das Reagenz wurde durch Erhitzen einer Mischung von 25 g Phenol p.a., 150 ml konzentrierter Schwefelsäure und 75 ml rauchender Schwefelsäure (15 % $SO_3$) für 2 h im siedenden Wasserbad hergestellt. 2 ml Phenoldisulfonsäure wurden vorsichtig zu 1 ml (verdünntem) Kulturmedium bei Zimmertemperatur gegeben, die Mischung auf -10 °C abgekühlt und 8 ml eiskalter konzentrierter Ammoniak in Portionen von 0.5 ml unter Schütteln zugesetzt. Anschließend folgte die Messung der Extinktion bei 430 nm. Eichkurven wurden mit $KNO_3$-Lösun-

gen (5-200 µg/ml) und Nitrat-freiem Kulturmedium als Blindwert aufgenommen. Chlorid störte in Konzentrationen, in denen es im Medium vorlag, nicht den Test.

Proteinbestimmungen ließen sich in Sphäroplastenlysaten und Fraktionen der Säulenchromatographie nach Fällung mit Trichloressigsäure (TCA) vornehmen. 0.2-0.5 ml Proteinlösung wurden mit dem gleichen Volumen einer 10 % (w/v) TCA-Lösung versetzt, 15 h bei 4 °C stehen gelassen, zentrifugiert, das Sediment in 0.1 N NaOH gelöst, neutralisiert, und die Proteinmenge nach der Folin-Methode [47] bestimmt.

Zur Messung des Glykogengehaltes wurden 10 ml Kultursuspension zentrifugiert (5 min, 2000 g), in 10 ml Natriumacetatpuffer pH 5.0 suspendiert, 20 s ohne Kühlung beschallt (Branson Sonifier, 30 % relative output) und zentrifugiert (10 min, 10000 g). 0.2-0.5 ml des klaren Überstandes, ergänzt zu 1 ml mit Puffer, wurden 20 min. mit 2 ml Glucoamylase/D-Glucose-Oxidase/Peroxidase-Reagenz[48] und mit ABTS (2,2'-Azino-bis-(3-äthyl-benzthiazolin-6-sulfonsäure)) als Farbstoff inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml 1 M HCl folgte die Messung der Extinktion bei 560 nm. Der Glykogengehalt von Eluaten bei der Säulenchromatographie ließ sich analog bestimmen.

Um eine quantitative Erfassung des Glykogens sicherzustellen, wurden abzentrifugierte Zelltrümmer auf etwa gebundenes $\alpha$-Glucan untersucht. Dazu dienten Zellen, deren Glykogen durch Assimilation von $^{14}CO_2$ markiert war. Die Zelltrümmer wurden in 50 mM Tris/Maleat-Puffer, pH 6.2, suspendiert, mit einem Überschuß an Glucoamylase 30 min. bei 35 °C inkubiert, über 2 ml

Anionen-Kationentauscher gegeben und das Eluat papierchromatographisch auf $^{14}$C-Glucose hin untersucht. Dabei ergab sich, das die Zelltrümmer keinerlei gebundenes α-Glucan enthielten, aus dem Glucoamylase $^{14}$C-Glucose hätte freisetzen können.

Radioaktivität von wässrigen Proben wurde durch Flüssigkeitsszintillation mit dem Packard TRI-CARB liquid scintillation spectrometer (Zählausbeute: $^{14}$C ≈ 90 %, $^{3}$H ≈ 30 %) bestimmt. 0.2-0.5 ml $^{14}$C-haltige Lösung wurde zu 8 ml Szintillator (500 ml Toluol, 2.5 g Butyl-PPD,(2-(4-tert.-Butylphenyl)-5-(4-biphenylyl)-1,3,4-Oxadiazol), 200 ml Scintisol solubilizer) gegeben und darauf geachtet, daß das externe Standardkanalverhältnis trotz Farbquench größer als 0.5 war.

## 5.6. Immobilisierte Enzyme für Affinitätschromatographie

### 5.6.1. Herstellung von Concanavalin A-Sepharose

a) Aktivierung

Die Aktivierung von Sepharose erfolgte nach der Bromcyanmethode[49]. 75 ml Sepharose 4B wurden mit 3 l Wasser auf der Fritte gewaschen, in 75 ml Wasser suspendiert, 150 ml 2M $Na_2CO_3$ zugegeben und die Mischung auf 0 °C abgekühlt (500 ml Becherglas). 15 g BrCN, gelöst in 7.5 ml Acetonitril wurden unter heftigem Rühren der Sepharose zugesetzt und die Mischung nach genau 1.5 min. auf einer Fritte nacheinander mit je 1 l eiskalter 0.1 M $NaHCO_3$-Lösung, Wasser, 0.2 M Natriumphosphatpuffer, pH 7.3, gewaschen.

b) Kupplung

0.25 g Concanavalin A, gelöst in 150 ml 0.2 M Natriumphosphatpuffer, pH 7.3, (0°C) wurden 15 h mit 75 ml aktivierter Sepharose bei 4°C geschüttelt, in eine Säule gefüllt und mit ca. 2 l 50 mM Tris/Maleat-Puffer, pH 6.5 (1 mM $CaCl_2$, 1 mM $MnCl_2$) bei 4°C gewaschen. Die Aufbewahrung erfolgte im gleichen Puffer unter Zusatz von 0.05 % $NaN_3$.

c) Bestimmung der Kapazität

50 mg Glykogen, gelöst in 20 ml Tris/Maleat-Puffer, pH 6.2, (1 mM $CaCl_2$, 1 mM $MnCl_2$) wurden mit 1 g feuchter Con A-Sepharose ( 2 ml) 3 h bei Zimmertemperatur oder 10 h bei 4°C geschüttelt. Die Abtrennung nicht adsorbierten Glykogens erfolgte in einer Pasteurpipette durch Waschen mit Puffer (3 ml), 1 M NaCl (3 ml) und Puffer (3 ml). Die Ablösung von Glykogen ließ sich mit 0.1 M Saccharose oder 0.01 M α-D-Methyl-Glucosid erreichen. Nach Dialyse gegen Wasser konnte der Glykogengehalt mit dem Glucoamylase-Reagenz[48] bestimmt werden.
Die Kapazität der hergestellten Con A-Sepharose betrug unter diesen Bedingungen 27 mg Glykogen/ g Feuchtgewicht.

5.6.2. Herstellung immobilisierter α-Amylase

Die Aktivierung von Sepharose erfolgte analog 5.6.1. Zur Kupplung wurden 50 mg Speichel-α-Amylase (spezifische Aktivität: 220 IU/mg) in 50 ml 200 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7.3, mit 75 ml aktivierter Sepharose 15 h bei 4°C geschüttelt und mit 2 l des gleichen Puffers bei 4°C gewaschen. Die Aktivität der immobilisierten α-Amylase betrug 43 IU/g feuchte Sepharose.

5.6.3. Herstellung von Butylsepharose

Die Aktivierung der Sepharose wurde nach 5.6.1. mit 3/4 des Ansatzes durchgeführt (50 ml Sepharose, 10 g BrCN in 5 ml $CH_3CN$), wobei als letzte Waschlösung 0.2 M $NaHCO_3$, pH 9.5, verwendet wurde. Die Kopplung erfolgte mit 27 g n-Butylamin in 100 ml 0.2 M $NaHCO_3$-Lösung, pH 9.5, für 20 h bei 4°C. Nach Einfüllen in eine Säule wurde mit je 300 ml 0.1 M Natriumacetatpuffer, pH 4.0, (0.5 M NaCl), 2 M Harnstoff (0.5 M NaCl), 0.1 M $NaHCO_3$-Puffer, pH 10.0, (0.1 M NaCl), abschließend mit 1 l 5 mM Tris/HCl-Puffer, pH 7.2, (1 mM EDTA, 14 mM Merkaptoäthanol) gewaschen.

5.7. Kultivierung von Anacystis nidulans

5.7.1. Zusammensetzung des Mediums

| | | |
|---|---|---|
| im Liter: | 1 g | $KNO_3$ |
| | 250 mg | $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$ |
| | 1 g | $K_2HPO_4$ |
| | 25 mg | $Ca(NO_3)_2 \cdot 4\ H_2O$ |
| | 165 mg | Na-Citrat $\cdot 2\ H_2O$ |
| | 4 mg | $Fe_2(SO_4)_3 \cdot 6\ H_2O$ |
| | 1 ml | Spurenelementekonzentrat[x] |

[x] im Liter: 32 mg Ammoniummolybdad

| | | |
|---|---|---|
| | 2.9 g | $H_3PO_3$ |
| | 1.8 g | $MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$ |
| | 79 mg | $CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$ |
| | 220 mg | $ZnSO_4 \cdot 7\ H_2O$ |

5.7.2. Batch-Kulturen

Anacystis nidulans, Stamm 1402-1 der Algensammlung der Universität Göttingen, wurde in einem Stickstoff-defizienten

Medium (0.1 g $KNO_3$/l) bei 40°C unter photoautotrophen Bedingungen gezüchtet. Die Begasung erfolgte mit Luft/$CO_2$-Gemischen (99 : 1, 4-10 l/h). Die Kulturen wurden kontinuierlich mit 2000 lux an der Oberfläche der Gefäße belichtet.

5.7.3. Kontinuierliche Kultivierung (Chemostat)

Für den Betrieb des Chemostaten wurde der Organismus zunächst als batch-Kultur in verschiedenen Medien mit einem Nitratgehalt von 0.05-0.5 g $KNO_3$/l, sowie im Standardmedium (1 g $KNO_3$/l) kultiviert. Belichtung und Begasung erfolgten kontinuierlich mit 2000 lux (3500 lux bei 0.5 g $KNO_3$/l), 15 l Luft/$CO_2$ pro h (300 ml Gefäß), 60 l/h (1 l Gefäß). Nachdem die Zellen die stationäre Wachstumsphase erreicht hatten (Erschöpfen der Stickstoffquelle im Medium), erfolgte die Umschaltung auf kontinuierlichen Betrieb. Die batch-Phase war für Zellen im Standardmedium bei einer Zelldichte von 0.4 mg Trockengewicht/ml beendet. Die entsprechenden Gefäße für Frischmedium und Überlauf wurden gemäß Fig.5 angeschlossen und die Belichtung erhöht auf 2000 bzw. 7000 lux (300 ml Chemostat, 3 cm Schichtdicke der Zellsuspension) oder 10000 lux (1 l Chemostat, 5 cm Schichtdicke der Zellsuspension). Andere Kulturparameter blieben konstant. Die Zugabe von vor-sterilisiertem Medium erfolgte mit einer Geschwindigkeit von 6-60 ml/h. Für die Experimente zum Ausmessen des Chemostaten wurden Proben in Intervallen von 5 - 10 h unter aseptischen Bedingungen aus dem Chemostatgefäß genommen und die Zelldichte, der Nitratgehalt des Mediums und der Glykogengehalt der Zellen bestimmt. Die Zuflußgeschwindigkeit des Mediums wurde um 5 ml/h erhöht, wenn die Werte mehrerer hintereinander bestimmter Proben konstant blieben. Die

Steigerung des Volumenwechsels erfolgte bis die Kultur in die Auswaschphase überging. Dabei variierten die totalen Kultivierungszeiten für den kontinuierlichen Betrieb zwischen 80 h (0.05 g $KNO_3$/l, 2000 lux) und 170 h (0.5 g $KNO_3$/l, 7000 lux), für das Standardmedium zwischen 120 h (2000 lux) und 250 h (7000 lux).

Für den Dauerbetrieb von mehreren Monaten wurde der Chemostat mit einem Volumen von 1 l verwendet. Dieser Kultur entstammten alle Zellen für die Experimente, die unter 6.3 bis 6.7 beschrieben sind. Die Kulturparameter wurden so eingestellt, daß der Glykogengehalt in den Zellen etwa ein Drittel der maximal akkumulierbaren Menge erreichte (10000 lux, 0.3 g $KNO_3$/l, D = 0.02 - 0.04 $h^{-1}$). Die steady-state Zellkonzentration ergab einen Wert von 1.45 mg Zelltrockengewicht/ml und einen Glykogengehalt von ca. 0.2 mg/ml Kultur.

5.7.4. Präparation von Sphäroplasten

0.1 - 3 l einer Chemostatkultur wurden je nach Verwendungszweck direkt oder nach Kultivierung unter Lichtentzug durch Zugabe von Sorbit-Lösung (siehe unten, 0.4 M Sorbit-Endkonzentration) und 30 µg/ml Lysozym unter Beibehaltung der Kulturbedingungen in Sphäroplasten überführt. Die Zeitdauer der Prozedur betrug 1.5 h (Licht) und 2 h (Dunkel). Die Ausbeute an Sphäroplasten ließ sich im Phasenkontrastmikroskop verfolgen. Die Ernte erfolgte durch Zentrifugation bei Zimmertemperatur (3 min, 3000 g).

Sorbit-Lösung: 374.5 g (2 Mol) Sorbit wurden in 150 ml 200 mM Phosphatpuffer, pH 7.0, gelöst (50°C), 2.5 g (6.7 mMol) EDTA zugegeben und mit dem gleichen Puffer auf 500 ml aufgefüllt.

## 6. Ergebnisse

### 6.1. Herstellung radioaktiver Substrate zur Charakterisierung Glykogen-abbauender Enzyme

Der α-Glucanabbau in A. nidulans, der als physiologischer Befund gesichert ist, setzt Enzymaktivitäten in der Zelle voraus, die in der Lage sind, 1,4- und 1,6-α-glucosidische Bindungen zu spalten. Wegen der Analogie zum bakteriellen Glykogenstoffwechsel läßt sich vermuten, daß in Frage kommende amylolytische Enzyme im Prinzip schon von anderen Mikroorganismen her bekannt sind. Die Art der Aktivität kann durch Inkubation mit verschiedenen Substraten und anschließender Analyse der Reaktionsprodukte ermittelt werden. Wegen der Empfindlichkeit der Nachweismethode war deshalb die Bereitstellung radioaktiver Substrate für vermutete Enzymaktivitäten notwendig. In Frage kommen als Substrate Glykogen, sowie seine Abbauprodukte, die sämtlich nur auf enzymatischem Weg zugänglich sind. Deshalb war die Reinigung von Hilfsenzymen wie Phosphorylase, Isoamylase, α- und ß-Amylase, Glucoamylase eine weitere Voraussetzung, da käufliche Präparationen nicht die erforderliche Reinheit aufwiesen.

Als Quelle für (U-$^{14}$C)-Glykogen dienten Zellen von A. nidulans, die zum Zweck der Glykogenakkumulierung in einem Stickstoff-defizienten Medium photoautotroph kultiviert wurden. Fig.3 zeigt Wachstum und Glykogengehalt der Zellen unter diesen Bedingungen. Nach Erschöpfen der Stickstoffquelle endet die Zellteilung und die Glykogenakkumulierung beginnt. Nach etwa 90 h ist der maximale Glykogengehalt in der Zelle erreicht.

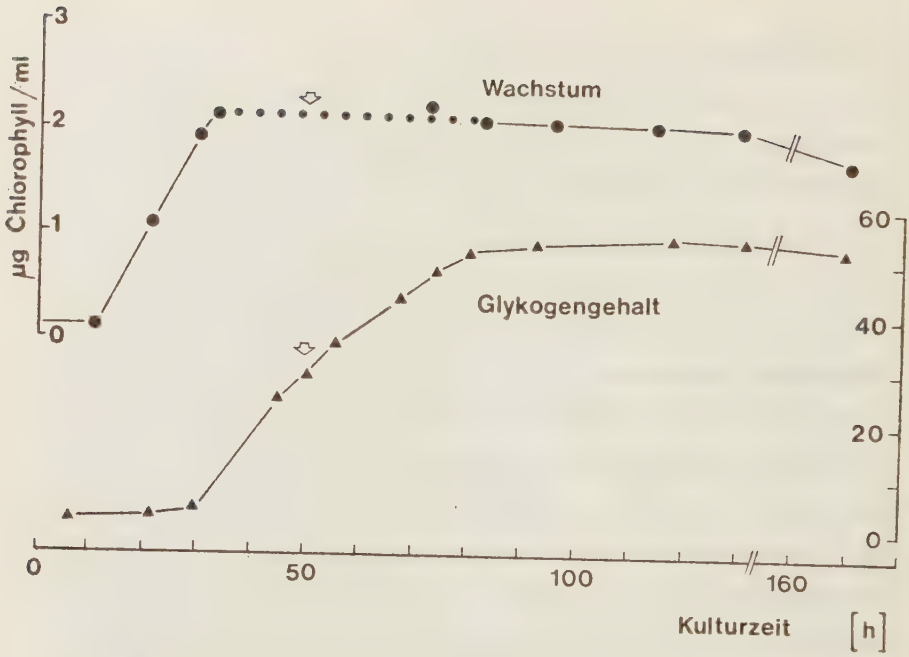


Fig.3 Wachstum und Glykogenakkumulierung von Anacystis nidulans, kultiviert in einem Stickstoffbegrenzten Medium in Gegenwart von Licht, Luft und $CO_2$; ⇩ zeigt die Zugabe von $NaH^{14}CO_3$ an.

$NaH^{14}CO_3$ wurde der Kultur nach ca. 50 h zugesetzt, da die Glykogensynthese unter diesen Bedingungen ein Hauptstoffwechselweg ist, und $^{14}CO_2$ vornehmlich in das α-Glucan eingebaut wird. Nach einer Assimilierungszeit von 24 h war von den Zellen mehr als 90 % der Radioaktivität aufgenommen worden.

6.1.1. Reinigung von (U-$^{14}$C)-Glykogen

Um eine schonende Isolierung des Glykogens zu ermöglichen, wurden Zellen, die einer Atmosphäre von $^{14}CO_2$ ausgesetzt waren, durch Behandlung mit Lysozym in Sphäroplasten überführt. Die Anwesenheit von Licht war dabei erforderlich, um einem

Glykogenabbau vorzubeugen. Nach der Präparation von Sphäroplasten folgte als nächster Schritt die Abtrennung von gefärbten Substanzen und Protein mit DEAE-Cellulose. Die Elutionsbedingungen wurden dabei so eingestellt, daß Glykogen im Durchbruch der Säule aufgefangen werden konnte, während mehr als 95 % der Proteine auf dem Ionentauscher verblieben. Mit Hilfe von Concanavalin A-Sepharose ließ sich (U-$^{14}$C)-Glykogen spezifisch aus dem Eluat der DEAE-Cellulose isolieren. Die Entfernung unspezifisch adsorbierter Substanzen erfolgte durch Waschen mit 1 M NaCl. Die Trennung des Con A-Glykongenkomplexes wurde mit Saccharose oder Methyl-α-D-Glucosid vorgenommen. Das Elutionsprofil der Con A-Säule ergab einen peak für (U-$^{14}$C)-Glykogen, in dem mehr als 90 % der gesamten Radioaktivität enthalten war, mit der die Säule beladen wurde. Im letzten Schritt wurde zur Entfernung von Salz und Saccharose dialysiert und gefriergetrocknet. Die Ausbeute betrug 2 mg (U-$^{14}$C)-Glykogen, ausgehend von 40 mg Zelltrockengewicht, mit einer spezifischen Radioaktivität von 5 mCi/mMol Glucoseeinheit. Tabelle 1 gibt eine Übersicht über die Isolierungsprozedur. Eine höhere spezifische Radioaktivität läßt sich im Prinzip durch eine längere Assimilierungszeit von $^{14}CO_2$ erreichen. Allerdings sinkt die mechanische Stabilität der Zellen mit steigendem Glykogengehalt, so daß dann die radiochemische Ausbeute von Schritt 2 kleiner wird, als in der Tabelle angegeben.

### 6.1.2. Enzymatischer Abbau von (U-$^{14}$C)-Glykogen

Folgende Hilfsenzyme, die zuvor aus verschiedenen Quellen isoliert und gereinigt worden waren, wurden für den definierten Abbau des Glykogens verwendet: Isoamylase spaltet alle 1,6-α-

| Prozedur | Vol. (ml) | Gesamt-Protein (µg) | (U-$^{14}$C)-Glykogen (µg) | Gesamt-Radioaktivität x $10^8$ dpm | Radiochemische Ausbeute (%) |
|---|---|---|---|---|---|
| 1. Photoassimilation von $NaH^{14}CO_3$ | - | - | - | 3.2 | - |
| Medium (verworfen) | 100 | n.b.[a] | n.b. | 0.3 | - |
| 2. $^{14}$C-markierte Zellen | 2 | n.b. | n.b. | 2.9 | 100 |
| 3. Sphäroplasten | 2 | n.b. | n.b. | 2.6 | 89.7 |
| Sorbit-Lösung (verworfen) | 50 | n.b. | n.b. | 0.3 | 10.3 |
| 4. Sphäroplasten-lysat | 5 | 1000 | 2500 | 1.9 | 65.6 |
| 5. Durchbruch DEAE-Cellulose | 6 | < 10 | 2400 | 1.7 | 58.6 |
| 6. Con A-Sepharose Waschelu at (verworfen) | 5 | < 10 | 200 | 0.1 | 3.5 |
| Saccharose-Eluat | 10 | < 10 | 2200 | 1.55 | 53.5 |
| 7. Lyophilisat | 0 | - | 2000 | 1.5 | 51.7 |

[a] n.b. = nicht bestimmt

Tabelle 1: Reinigung von (U-$^{14}$C)-Glykogen aus Anacystis nidulans

glukosidische Bindungen und ergibt als Reaktionsprodukte ($U-^{14}C$)-markierte Maltodextrine, die durch Papierchromatographie weiter aufgetrennt wurden; ß-Amylase erzeugt ein Grenzdextrin und ($U-^{14}C$)-Maltose; die gemeinsame Verdauung mit Isoamylase und ß-Amylase führt zu einer vollständigen Umwandlung zu ($U-^{14}C$)-Maltose; der Abbau mit Glucoamylase ergibt ($U-^{14}C$)-Glucose, während Phosphorylase $^{14}C$-Glucose-1-phosphat und ein Grenzdextrin freisetzt. Fig.4 zeigt die Reaktionsprodukte der ersten vier Enzyme nach papierchromatographischer Trennung. Die Separation ($U-^{14}C$)-markierter Maltodextrine gelang bis Maltoheptaose. Saccharide mit einem höheren Molekulargewicht machten ca. 50 % der gesamten Radioaktivität aus. Die Ausbeute der anderen Dextrine betrug: Maltotriose,(1.9 %); Maltotetraose, (5.1 %); Maltopentaose, (9.1 %); Maltohexaose, (13.1 %); Maltoheptaose, (18.1 %). Der erschöpfende Abbau (2-fache Inkubation des Substrates) von

Fig.4 Papierchromatographische Trennung von Produkten der Reaktion verschiedener Hilfsenzyme mit ($U-^{14}C$)-Glykogen

($U-^{14}C$)-Glykogen und 2 mg Phytoglykogen als Träger wurden in 10 mM Natriumacetatpuffer pH 5.0 mit einem Überschuß an Isoamylase, Isoamylase und ß-Amylase, ß-Amylase, Glucoamylase 2 h bei 35°C inkubiert. Proben mit ß-Amylase enthielten 5 mM Mercaptoäthanol und Serumalbumin (1 mg/ml). Die Reaktionprodukte jeder Inkubation wurden papierchromatographisch getrennt (n-Butanol:Pyridin:Wasser, 6:4:3, v/v/v, mehrfach aufsteigend) und die Radioaktivität analysiert. Die Identifizierung erfolgte an Hand einer co-chromatographierten Maltodextrin-Standardmischung, die , nach Besprühen mit Glucoamylase, mit einem $AgNO_3/NaOH/Na_2S_2O_3$-Reagenz entwickelt wurde (unterer Teil des Diagramms).
■ Isoamylase, o Isoamylase und ß-Amylase, □ ß-Amylase,
● Glucoamylase

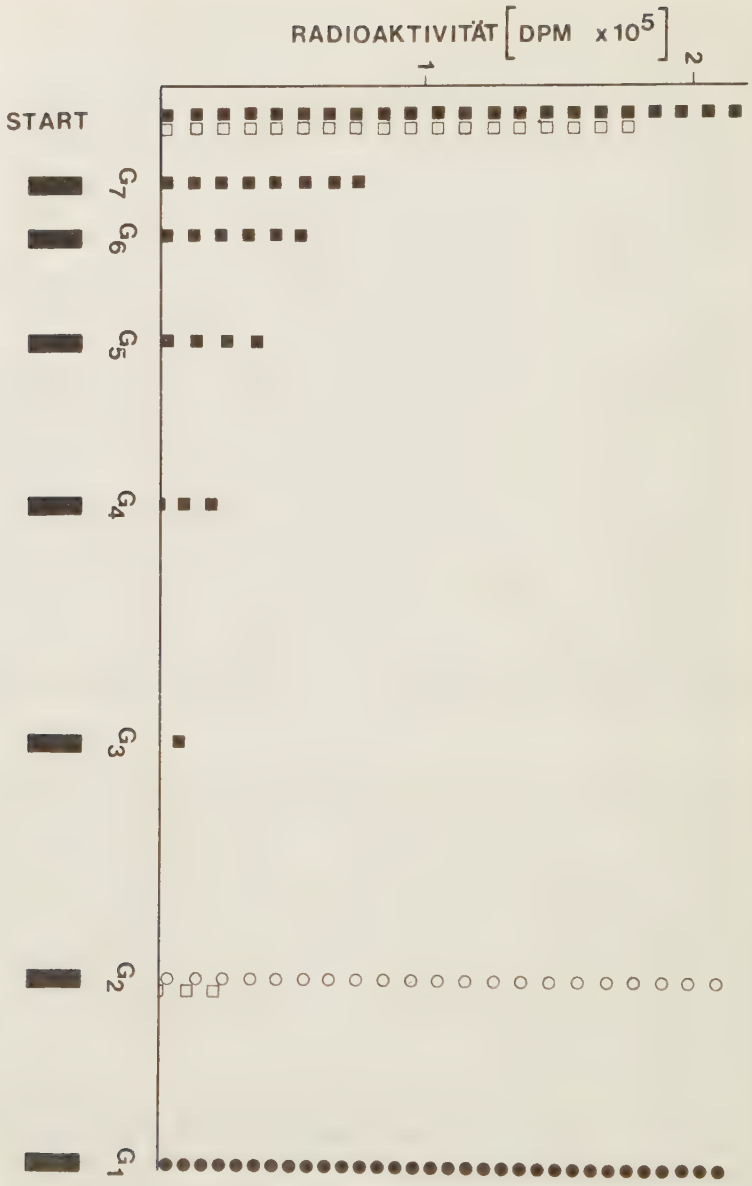


Fig. 4

(U-$^{14}$C)-Glykogen mit Phosphorylase ergab eine verbleibende Radioaktivität für das Grenzdextrin von ca. 60 %. Die mit Hilfe von Glucoamylase hergestellte (U-$^{14}$C)-Glucose wies bei einer entsprechenden Kontrolle einen Reinheitsgrad von mehr als 95 % aus.
Zum Nachweis der am Glykogenabbau in A. nidulans beteiligten Enzyme wurden von den hergestellten Substraten (U-$^{14}$C)-Glykogen und (U-$^{14}$C)-Phosphorylase-Grenzdextrin, sowie eine (U-$^{14}$C)-Maltodextrin-Mischung und markierte Glucose zur Identifizierung eingesetzt.

6.2. Kontinuierliche Kultivierung von A. nidulans in einem Chemostaten unter substrat- und lichtlimitierenden Bedingungen

Bei den Experimenten zur Licht/Dunkel-Regulation, die unter 6.5. beschrieben sind, zeigte sich, daß bei einer Kultivierung des Organismus als stationäre Kultur, trotz sorgfältiger Standardisierung der Kulturbedingungen keine sinnvolle Aussage über auffällige Aktivitätsänderungen im Licht/Dunkel-Wechsel möglich waren. Dies lag daran, daß Enzymaktivitäten aus verschiedenen Ansätzen miteinander verglichen werden mußten, während der Chlorophyll- und Glykogengehalt ständig Schwankungen unterworfen war. Um zu physiologisch einheitlichem Zellmaterial zu kommen, war es deshalb nötig, Anacystis unter den Bedingungen der kontinuierlichen Kultur zu züchten. Der erste Schritt bestand darin, einen Chemostaten zu konstruieren. Fig.5 gibt eine schematische Zeichnung wieder. Um ein separates Sterilisieren der einzelnen Gefäße zu ermöglichen, wurden (autoklavierbare) Gummischläuche als Verbindungsstücke verwendet. Das Volu-

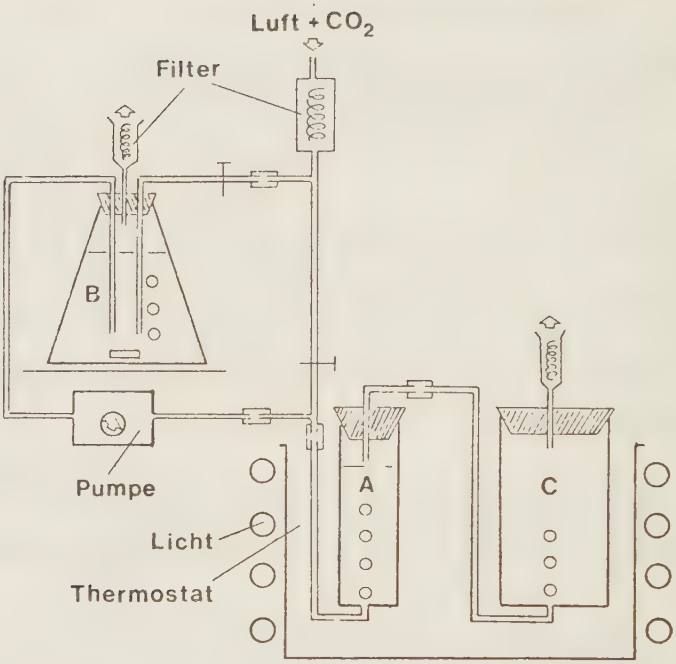


Fig.5 Schema des Chemostaten für die kontinuierliche Kultivierung von A. nidulans

Während der batch-Phase wuchs der Organismus in Gefäß A (400 ml). Für den kontinuierlichen Betrieb wurde vorsterilisiertes Medium aus Gefäß B (2 - 5 l) in das Chemostatgefäß A gepumpt (6 - 60 ml/h) und die Zellen im Gefäß C (1 l) gesammelt. Ausführliche Kulturbedingungen sind unter 5.7.3. beschrieben.

men des Chemostaten kann vergrößert werden, wobei allerdings zu beachten ist, daß mit steigender Schichtdicke der Kultursuspension die Lichtausbeute und damit die Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen verringert wird. Ein längerer Betrieb des Apparates zeigte, daß sich der Organismus an der dem Licht zugewandten Seite des Chemostatgefäßes in dünner Schicht an der Glaswand festsetzt, wodurch die Lichtausbeute ebenfalls verringert wird. Aus diesem Grund wurde das entsprechende Gefäß etwa alle 5 Tage gewechselt. Das vorsterilisierte Medium in Reservoir B wurde langsam begast und mit einem Magnetrührer durchmischt. Zur Vermeidung von Kontaminationen, die in der Regel durch den Überlauf des Chemostaten eindringen, erfolgte ein Auswaschen der Zellen durch einen ständigen Gasstrom.

6.2.1. Wachstum und Nitratverwertung in Stickstoff-begrenzten Medien

An das Zellmaterial, das für die Untersuchung des α-Glucanabbaus verwendet werden sollte, mußte als Anforderung die Glykogenmobilisierung in den Zellen gestellt werden, da die entsprechenden Enzyme dann vorhanden sind. Für den Chemostatbetrieb bedeutete dies, daß die Zellen in die Phase der Glykogenakkumulierung zu versetzten sind, um sie anschließend unter geeigneten Bedingungen zur Mobilisierung zu veranlassen. Als Medien für den kontinuierlichen Betrieb kamen deshalb nur solche mit einer das Wachstum begrenzenden Komponente in Frage. Fig.6 zeigt Wachstum und Nitratverwertung von Anacystis in Medien mit einem Stickstoffgehalt von 0.05-0.5 g $KNO_3$/l. Im linken Teil (batch-Kultur) erkennt man, daß die Zellen die stationäre Wachstumsphase erreichen, wenn $KNO_3$, die einzige Sickstoffquelle,

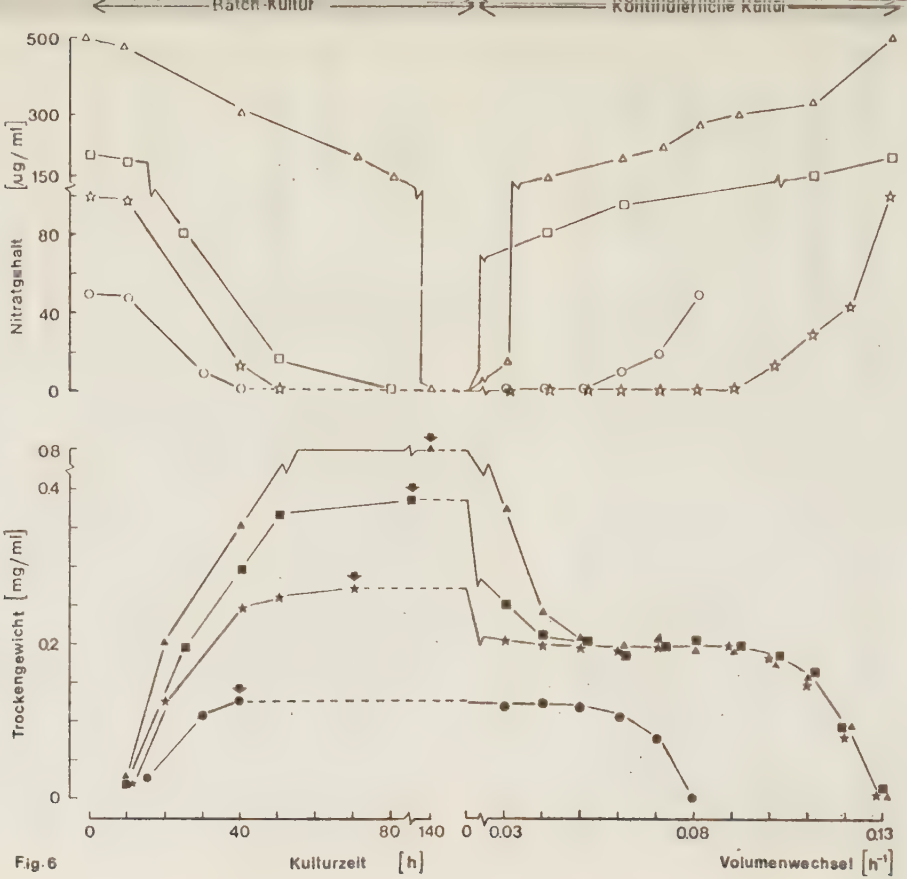
Batch-Kultur
Kontinuierliche Kultur
Nitratgehalt [µg/ml]
500
300
150
80
40
0
Trockengewicht [mg/ml]
0.8
0.4
0.2
0
0
40
80
140
0
0.03
0.08
0.13
Kulturzeit [h]
Volumenwechsel [h⁻¹]

Fig. 6

Fig.6 Wachstum und Nitratverwertung während der diskontinuierlichen und kontinuierlichen Kultivierung von A. nidulans
Der Organismus wuchs unter photoautotrophen Bedingungen bei einer Lichtintensität von 7000 lux an der Oberfläche des Chemostatgefäßes. Der Beginn der kontinuierlichen Kultur ist durch einen Pfeil angezeigt. Geschlossene Symbole: Zelltrockengewicht; offene Symbole: Nitrataufnahme.
○–○, ●–● 0.05 g $KNO_3$/l; ☆–☆, ★–★ 0.1 g $KNO_3$/l;
□–□, ■–■ 0.2 g $KNO_3$/l; △–△, ▲–▲ 0.5 g $KNO_3$/l.

erschöpft ist. Unterschiedliche Zelldichten werden während der batch-Phase in Abhängigkeit von der Menge $KNO_3$ erreicht, die dem Medium ursprünglich zugesetzt wurde. Nach Erschöpfen der Stickstoffquelle beginnen die Zellen, Glykogen zu akkumulieren. Äußerlich sichtbar erfolgt ein Farbwechsel der Kultur von blau-grün nach gelb, da die Phycobiline abgebaut werden. Verbindet man nun das Kulturgefäß mit einem Reservoir (vgl. Fig.5), das Medien mit unterschiedlichem Nitratgehalt enthält und geht auf kontinuierleichen Betrieb über, so bildet sich nach einiger Zeit ein Fließgleichgewicht im Chemostatgefäß aus (Fig.6, rechter Teil). Die Zelldichte im stationären Zustand wurde mit 0.2 mg Trockengewicht pro ml Kultursuspension bei einer Beleuchtungsintensität von 7000 lux bestimmt. Dieser Wert entsprach ungefähr der Zelldichte einer Kultur in der stationären Phase, deren Medium einen Nitratgehalt von 0.1 g/l aufwies. Kulturen mit einem ursprünglichen $KNO_3$-Gehalt von mehr als 0.1 g/l erreichten während der batch-Phase eine höhere Zelldichte und wurden deshalb zu Anfang des kontinuierlichen Betriebs auf das Niveau der steady-state Zelldichte bei 7000 lux ausgewaschen. Für diese Zeit liegt kein stabiles Fließ-

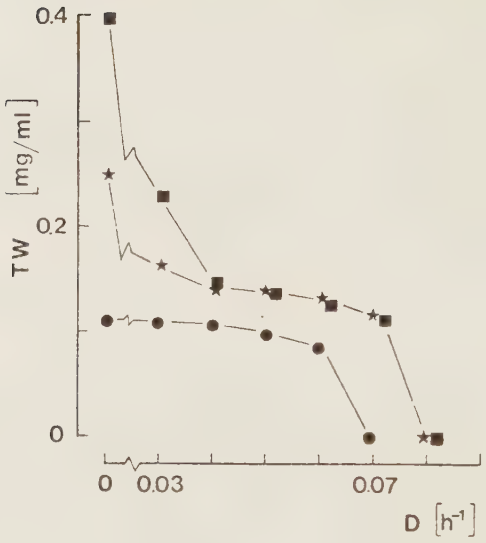


Fig.7 Wachstum von Zellen unter kontinuierlichen Bedingungen bei einer Lichtintensität von 2000 lux.

D = Volumenwechsel, TW = Trockengewicht, ●-● 0.05 g $KNO_3$/l, ★-★ 0.1 g $KNO_3$/l, ■-■ 0.2 g $KNO_3$/l.

gleichgewicht im Chemostaten vor. Senkt man den Nitratgehalt des Mediums während der kontinuierlichen Kultivierung unter 0.1 g/l, so resultiert daraus eine Zelldichte, die unterhalb des Niveaus liegt, das dem steady-state entspricht. In Fig.7 ist das Wachstum der Zellen bei einer Lichtintensität von 2000 lux unter sonst gleichen Bedingungen dargestellt. Die steady-state Zelldichte liegt hier mit 0.14 mg Trockengewicht/ml erwartungsgemäß tiefer. Der Einfluß von Licht und Nitratgehalt auf die Wachstumsgeschwindigkeit ($\mu$) läßt sich an Hand von Fig. 6 und Fig.7 folgendermaßen darstellen: $\mu$ wächst bei vorgegebener Licht-

intensität (2000 lux und 7000 lux) mit dem Nitratgehalt des Mediums, bis die Zelldichte im Chemostaten 0.14 bzw. 0.2 mg Trockengewicht/ml erreicht (Substratlimitierung). Der Auswaschpunkt, der die maximale Wachstumsgeschwindigkeit ($\mu_c$) der Zellen unter diesen Bedingungen angibt, wurde bestimmt zu $\mu_c$ = 0.06 $h^{-1}$ (0.05 g $KNO_3$/l, 2000 lux), $\mu_c$ = 0.06 $h^{-1}$ (0.05 g $KNO_3$/l, 7000 lux) und $\mu_c$ = 0.1 $h^{-1}$ (0.1 g $KNO_3$/l, 7000 lux). Die beiden $\mu_c$-Werte für 0.05 g $KNO_3$/l müssen für 2000 lux und 7000 lux gleich sein, da Substratlimitierung vorliegt und $\mu$ in diesem Bereich lichtunabhängig ist. Nitratgehalte > 0.1 g/l führen zu einem teilweisen Auswaschen der Kultur bis eine Zellkonzentration von 0.14 bzw. 0.2 mg/ml erreicht ist; dann ist $\mu$ nur noch eine Funktion der Lichtintensität. Experimentell bestimmt wurden $\mu_c$ = 0.07 $h^{-1}$ (0.1-0.2 g $KNO_3$/l, 2000 lux) und $\mu_c$ = 0.1 $h^{-1}$ (0.1-0.5 g $KNO_3$/l, 7000 lux). In diesem Bereich ist $\mu$ durch Licht limitiert, und die Stickstoffquelle kann nicht mehr vollständig verwertet werden. Deshalb erscheint $KNO_3$ im Überlauf des Chemostaten (Fig.6)

6.2.2. Glykogengehalt der Zellen und Produktbildungsgeschwindigkeiten

Während des Wachstums der Zellen als statische Kultur wurden die Bedingungen so gewählt, daß eine Glykogenakkumulierung erfolgen konnte. Fig.8, linker Teil zeigt den Anstieg des Glykogengehaltes für Kulturen mit einem Nitratgehalt von 0.05-0.5 g/l. Unterwirft man glykogenhaltige Zellen kontinuierlichen Kulturbedingungen, so erfolgt ein Wachstum auf Kosten des intrazellulär gespeicherten Polysaccharids. Der Glykogengehalt pro ml Kultur nimmt mit steigender Verdünnungsrate ab (Fig.8,

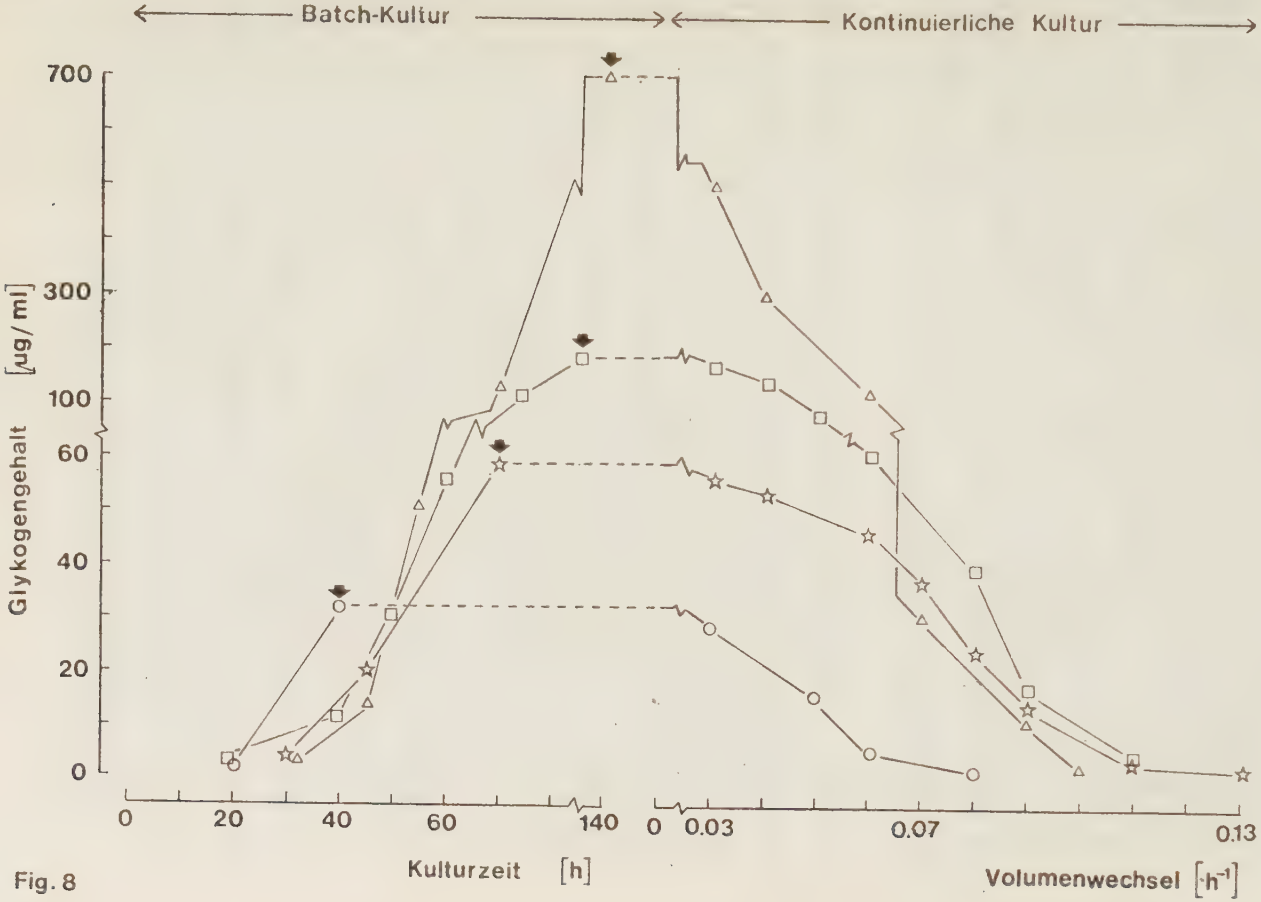
Batch-Kultur
Kontinuierliche Kultur
Glykogengehalt [µg/ml]
700
300
100
60
40
20
0
0
20
40
60
140
0
0.03
0.07
0.13
Kulturzeit [h]
Volumenwechsel [h⁻¹]

Fig. 8

Fig.8 Glykogengehalt von Zellen während batch- und kontinuierlicher Kultivierung bei einer Lichtintensität von 7000 lux Zur Erklärung der Symbole vgl. Fig.6 .

rechter Teil). Die Farbe der Zellen wechselt von gelb zu blaugrün, wodurch eine Regeneration der Phycobiline angezeigt wird. Hungerbedingungen bestehen für den Organismus jedoch bis zu einer Verdünnungsrate von etwa 0.08 $h^{-1}$ und die Zellen enthalten stets Glykogen.

Die Ausbeute an Zellen, ausgedrückt als Produktbildungsgeschwindigkeit (mg/l·h), für die Kultivierung mit 7000 lux ist in Fig.9 dargestellt. Liegen steady-state Bedingungen vor, führt eine

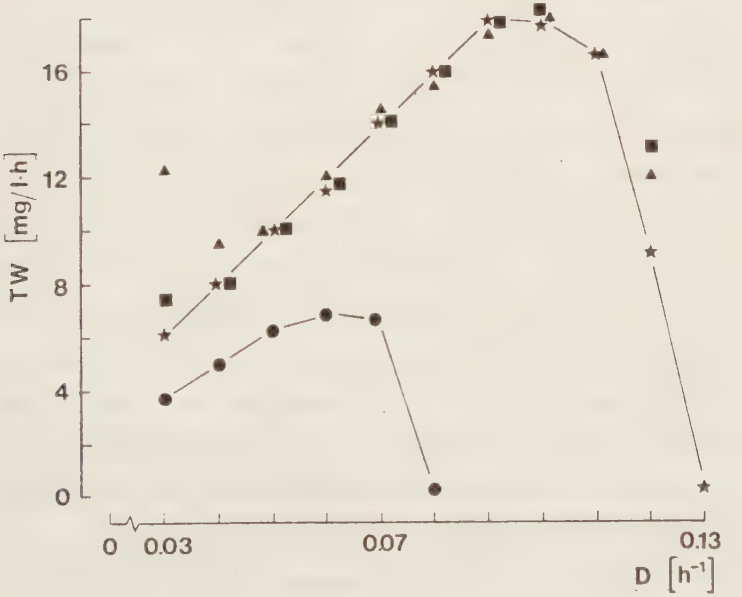


Fig.9 Bildung von Zellmasse als Funktion der Verdünnungsrate bei einer Lichtintensität von 7000 lux.

Die Symbole entsprechen dem Nitratgehalt des Mediums wie in Fig.6 beschrieben; D = Volumenwechsel, TW = Trockengewicht.

Steigerung des Volumenwechsels (D) zu einer Erhöhung der Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen. Dabei bleibt die Zellkonzentration bei kostanter Lichtintensität und für eine feste Zusammensetzung des Mediums ebenfalls konstant (vgl. Fig.6). Pro Zeiteinheit erhält man jedoch mit zunehmendem Volumenwechsel mehr Zellmasse. D läßt sich steigern, bis die maximale Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen unter den gegebenen Bedingungen erreicht ist. Darüber hinaus erfolgt ein Auswaschen der Kultur. Experimentell wurden maximale Werte bestimmt zu: 7 mg TW/l·h (0.05 g $KNO_3$/l, TW = Trockengewicht) und 17 mg TW/l·h (0.1-0.5 g $KNO_3$/l). Der Auswaschpunkt für Kulturen, die mit 7000 lux beleuchtet wurden, ergab sich zu D = 0.06 $h^{-1}$ (0.05 g $KNO_3$/l) und D = 0.1 $h^{-1}$ (0.1-0.5 g $KNO_3$/l).
Fig.10 zeigt die Bildungsgeschwindigkeit von Glykogen bei 2000 lux und 7000 lux. Da mit fortschreitender Verdünnung der Glykogengehalt der Zellen sinkt (Wachstum auf Kosten des Reservekohlenhydrats) liegt der Maximalwert für die Bildungsgeschwindigkeit von Glykogen unter dem für die Zellmasse. Bestimmt wurden für D = 0.06 $h^{-1}$ (0.1 g $KNO_3$/l, 7000 lux) 3 mg Glykogen/l·h bzw. für D = 0.04 $h^{-1}$ (0.1 g $KNO_3$/l, 2000 lux) 1.5 mg Glykogen/ l·h. An Hand des Diagramms läßt sich praktisch jeder beliebige Glykogengehalt der Zellen einstellen, wenn man Lichtintensität, Nitratgehalt des Mediums und den Volumenwechsel aufeinander abstimmt. Für die meisten Experimente in Zusammenhang mit der Licht/Dunkel-Regulation wurde der Chemostat so justiert, daß der Organismus ca. 1/3 der maximal akkumulierbaren Glykogenmenge enthielt.

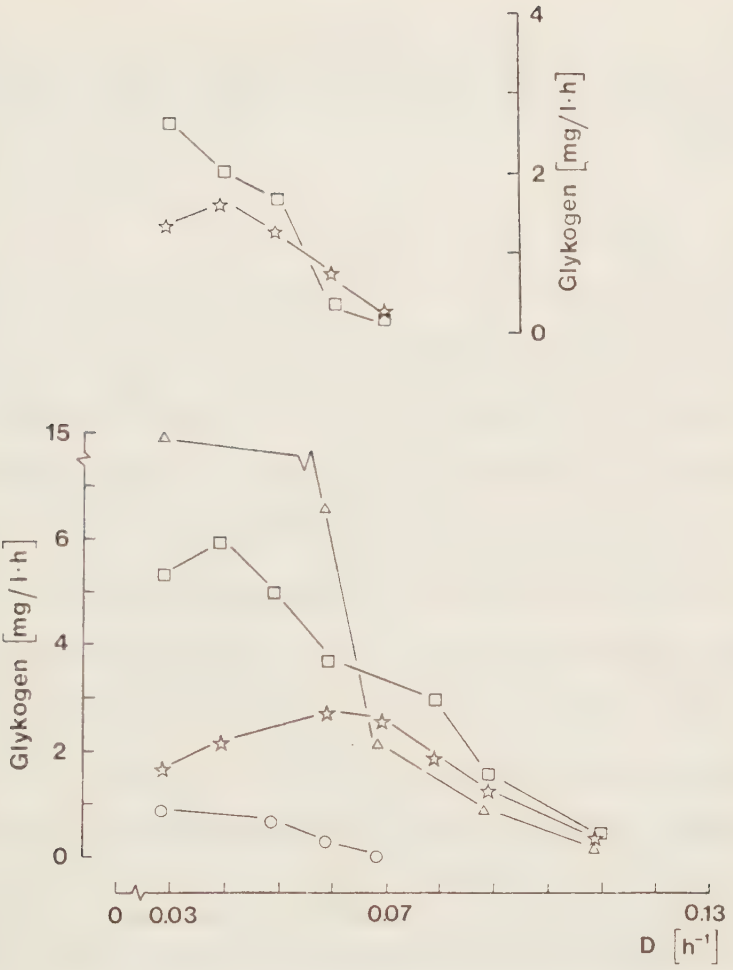


Fig.10 Bildungsgeschwindigkeit von Glykogen bei 2000 lux (oben) und 7000 lux (unten).

o–o 0.05 g $KNO_3$/l, ☆–☆ 0.1 g $KNO_3$/l, □–□ 0.2 g $KNO_3$/l, △–△ 0.5 g $KNO_3$/l; D = Volumenwechsel.

Fig.11 Zelldichte und Bildungsgeschwindigkeit von Zellmasse während der kontinuierlichen Kultivierung in einem Vollmedium bei 2000 (a) und 7000 lux (b). D = Volumenwechsel, TW = Trockengewicht.

6.2.3. Wachstum im Standardmedium

Neben der kontinuierlichen Kultivierung von glykogenhaltigen Zellen, wurde A. nidulans zur Kontrolle unter den gleichen Chemostatbedingungen im Standardmedium (1 g $KNO_3$/l) gezüchtet. Da dieses keine begrenzende Komponente enthält, läßt sich der Chemostat nur lichtlimitiert betreiben. Die Zellen enthalten keine nennenswerten Mengen an Glykogen. Fig.11 zeigt das Wachstum sowie die Bildungsgeschwindigkeit der Zellmasse bei Lichtintensitäten von 2000 lux und 7000 lux. Maximalwerte für die Wachstumsgeschwindigkeit ($\mu_c$) und für die Zellmasse lassen sich bestimmen zu $\mu_c = 0.09\ h^{-1}$ (2000 lux), 10 mg TW/ml·h (D = 0.08 $h^{-1}$) und $\mu_c = 0.15\ h^{-1}$ (7000 lux), 23 mg TW/l·h (D = 0.13 $h^{-1}$). Vergleicht man $\mu_c$-Werte von Fig.11 mit solchen aus Fig.6, erkennt man, daß der Organismus im Standardmedium eine höhere maximale Wachstumsgeschwindigkeit erreicht. Dieser Befund steht im Widerspruch zu dem, was man erwarten sollte. Eine Chemostatkultur, die unter den gezeigten Bedingungen nicht substratlimitiert ist (vgl. Fig.6, oberer Teil, $KNO_3$ im Überlauf), wenig Glykogen enthält (Fig.10) sollte den gleichen $\mu_c$-Wert erreichen, wie Zellen die im Vollmedium kultiviert werden. Unterschiedlich für beide Kulturen war nur die Vorbehandlung während der batch-Phase. Im einen Fall erfolgte der Übergang zum Chemostaten aus der stationären, im anderen aus der exponentiellen Phase heraus. Ein exakte Erklärung, warum erstere Zellen nach Überführung in ein vollständiges Medium weniger effizient wachsen, läßt

Fig. 11

sich derzeit nicht geben. Eine Vermutung geht dahin, daß eine oder mehrere Komponenten, die für den Stoffwechsel essentiell sind, unter Hungerbedingungen irreversibel beschädigt werden, so daß die beobachtete Kultivierungszeit für eine Regeneration nicht ausreichte.

### 6.2.4. Übergang vom Substrat- zum Lichtlimitierten Chemostaten

Neben der Anwendung des Chemostaten als Quelle für einheitliches Zellmaterial, das in weiteren Experimenten untersucht werden sollte, lassen sich in einer kontinuierlichen Kultur auch die Parameter für Wachstum und Glykogensynthese bestimmen. Analog zu einem Lineweaver-Burk-Diagramm kann für eine Chemostatkultur die maximale Wachstumsgeschwindigkeit $\mu_c$ unter vorgegebenen Randbedingungen gegen die begrenzende Substratkonzentration im Medium ($KNO_3$) doppelt reziprok aufgetragen werden. In Fig.12 sind die experimentellen Daten aus Fig.6 und Fig.7 auf diese Weise dargestellt. Zusätzlich wurde für eine Kultur (0.075 g $KNO_3$/l, 7000 lux) zur Ermittlung des $\mu_c$-Wertes der Auswaschpunkt bestimmt. Im Diagramm ist deutlich der Übergang von substrat- zu lichtlimitierenden Bedingungen zu erkennen. Für Kurve b gilt beispielsweise: $\mu_c$ erhöht sich (entsprechend wird $\mu_c^{-1}$ kleiner) mit steigender Nitratkonzentration im Medium, bis ein Wert von 0.1 g/l ($s^{-1}$ = 10) erreicht ist (Bereich der Substratlimitierung). Alle höheren Nitratkonzentrationen ergeben den gleichen $\mu_c$-Wert, da nun lichtlimitierende Bedingungen vorliegen. Im Prinzip ergibt sich eine Kurvenschar, wobei der Bereich der Substratbegrenzung mit steigender Lichtintensität

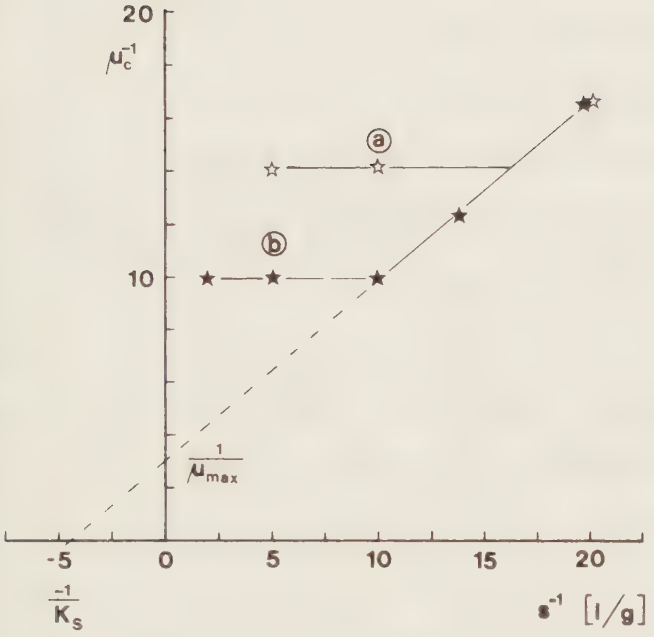


Fig.12 Doppelt reziproke Auftragung der spezifischen Wachstumsgeschwindigkeit $\mu_c$ ($h^{-1}$) bei verschiedenen Nitratkonzentrationen s (g/l).

Die Kulturen wurden entweder mit 2000 lux (a) oder 7000 lux (b) belichtet.

größer wird. Wie in Fig. 12 angedeutet, läßt sich (eine praktisch nicht realisierbare) Extrapolation auf unendlich hohe Lichtintensität vornehmen. Die maximale Teilungsgeschwindigkeit, zu der der Organismus unter diesen Bedingungen fähig ist, ergibt sich als Ordinatenabschnitt ($\mu_{max}$ = 0.33 $h^{-1}$), die

scheinbare Sättigungskonzentration für halb-maximales Wachstum als Abzissenabschnitt ($K_s$ = 0.22 g $KNO_3$/l). Man kann daraus abschätzen, daß der Organismus für ein optimales Wachstum Nitratkonzentrationen > 0.22 g/l benötigt. Das Standardmedium, das ein Minimalmedium darstellt, trägt dem mit 1 g $KNO_3$/l Rechnung. In Tabelle 2 ist das Wachstum von Anacystis in kontinuierlicher Kultur zusammengefaßt. Für jedes Experiment sind die Verdopplungszeiten unter einem gegebenen Satz von Kulturbedingungen für den substrat- und lichtlimitierten Chemostratbetrieb angegeben.

| Nitrat-konzentration (g/l) | Licht-intensität (lux) | Verdopp-lungszeit (h) |
|---|---|---|
| 0.05 | 7000 | 11.6 |
| 0.1-0.5 | 7000 | 6.9 |
| 0.05 | 2000 | 11.6 |
| 0.1-0.5 | 2000 | 9.9 |
| 1.0 | 2000 | 7.7 |
| 1.0 | 7000 | 4.6 |

Tabelle 2: Zusammenhang zwischen der Nitratkonzentration im Medium, der Lichtintensität und der Verdopplungszeit während der kontinuierlichen Kultivierung von A. nidulans.

## 6.3. Charakterisierung von Enzymen des α-Glucanabbaues in *Anacystis nidulans*

### 6.3.1. Enzymkombinationen für den Glykogenabbau in *A. nidulans*

Unter der Annahme, daß in einem Organismus nur eine begrenzte Anzahl von Enzymen für einen Stoffwechselweg vorkommen, wurde nach möglichen Kombinationen für den Abbau von Glykogen in *Anacystis* gesucht. Diese Enzyme müssen die Fähigkeit haben, 1,4-α- und 1,6-α-glucosidische Bindungen zu spalten. Ferner kann man annehmen, daß eine hydrolytische und phosphorylytische Bindungsspaltung erfolgt. Für *Synechococcus* 6301 ist eine Phosphorylase beschrieben[ ], während Glucanohydrolasen bislang nicht bekannt sind. Die physiologischen Bedingungen, unter denen ein Glykogenauf- und -abbau erfolgt, lassen eine Analogie zum (intrazellulären) Glykogenstoffwechsel in Bakterien zu. Als 1,6-α-Hydrolasen kommen die in Bakterien unter dem Begriff "direct debranching enzymes" beschriebenen Isoamylasen vor, die Glykogen sowie seine Abbauprodukte als Substrat verwenden (*Pseudomonas*-Arten[51], *Cytophaga*[52]) und eine Isoamylase aus dem Reservestoffwechsel von *E. coli*, die eine ausgeprägte Spezifität für das Phosphorylase-Grenzdextrin besitzt[53]. Davon zu trennen sind die "indirect debranching enzymes" aus Hefe- und Säugetierzellen, die in einer Peptidkette sowohl eine Transferase- als auch Amylo-1,6-α-glucosidase-Aktivität aufweisen. Als 1,4-α-Hydrolasen kommen in Bakterien und Pflanzen α-Amylasen und ß-Amylasen (nur in Pflanzen) vor, die Glykogen als Substrat verwenden und α-Glucosidasen, die Maltodextrine abbauen.

Um mögliche Enzymkombinationen für den Glykogenabbau in *Anacys-*

tis zu erfassen, wurden als Substrate Glykogen und Phosphorylase-Grenzdextrin (in unmarkierter und $^{14}C$-markierter Form), sowie p-Nitrophenyl-glucosid eingesetzt und ihre Reaktionsprodukte analysiert. Die Herstellung der Substrate ist unter 6.1. beschrieben.

6.3.2. Analyse der Reaktionsprodukte

Voraussetzung für das Auffinden glykogenabbauender Enzymaktivitäten war, daß sich der Organismus in einer Abbauphase befand, da er dann über entsprechende Aktivitäten verfügen muß.

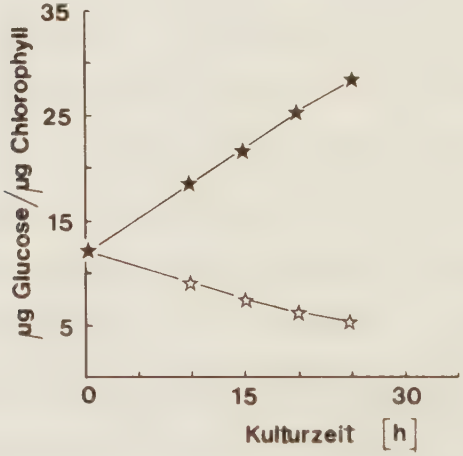


Fig.13 Glykogengehalt von Zellen während der Kultivierung im Licht und im Dunkeln.

Eine Chemostatkultur, die glykogenhaltige Zellen enthielt, wurde geteilt und stationär im Dunkeln, bzw. im Licht (Kontrolle) gehalten. Die Glykogenbestimmung erfolgte enzymatisch nach Aufschluß der Zellen mit Ultraschall.

Deshalb wurde glykogenhaltigen Zellen aus der Chemostatkultur für 10 - 15 h das Licht entzogen. Fig.13 zeigt den Abbau von Glykogen unter diesen Bedingungen. Während der Dunkelphase erfolgte die Präparation von Sphäroplasten (5.5.4.), die durch Zentrifugation geerntet und anschließend lysiert wurden. Das zentrifugierte Sphäroplastenlysat enthielt Glykogen, alle löslichen Proteine, sowie einen Teil der gefärbten Substanzen und wurde auf verschiedene Enzymaktivitäten hin getestet. Eine weitere Auftrennung von Proteinen konnte mit Hilfe von DEAE-Cellulose erreicht werden. Zur Elution wurde ein Stufengradient 0 - 1 M NaCl verwendet.

Folgende Substrate wurden zur Aktivitätsbestimmung im Sphäroplastenlysat und im Eluat der DEAE-Cellulose eingesetzt; die Art der Enzymaktivität ist in ( ) angegeben:

1. Glykogen und Phosphorylase-Grenzdextrin (allgemeiner Test für amylolytische Enzyme)
2. p-Nitrophenyl-α-D-Glucosid (α-Glucosidasen)
3. (U-$^{14}$C)-markiertes Glykogen bzw. Phosphorylase-Grenzdextrin (amylolytische Enzyme)
4. wie 3., aber in Anwesenheit von Phosphat (zusätzlicher Hinweis auf Phosphorylase)
5. Glucose-1-phosphat

Die Ergebnisse der Inkubationen sind in den Tabellen 3 und 4 zusammengefaßt. Man erkennt aus den Experimenten A-C (Tabelle 3), daß ein Nachweis reduzierender Endgruppen sowie die Bestimmung von p-Nitrophenolat durch spektralphotometrische Tests im Sphärolysat nicht möglich ist. Der Grund hierfür ist in der hohen Eigenabsorption der Blindwerte zu suchen. Erst durch Inkubation

| Exp. | Substrat | Test | Aktivität | Identifizierung radioaktiver Reaktionsprodukte |
|---|---|---|---|---|
| A | Glykogen | reduzierende Endgruppen | n.b. | |
| B | Grenz-dextrin | reduzierende Endgruppen | n.b. | |
| C | p-Nitrophe-nyl-glucosid | p-Nitro-phenolat | n.b. | |
| D | $^{14}$C-Glykogen | P.c. | - | Gly |
| E | $^{14}$C-Grenz-dextrin | P.c. | + | GD, $G_n$, $G_4$, $G_1$ |
| F | $^{14}$C-Glykogen + $PO_4^{3-}$ | P.c. | + | Gly, $G_n$, $G_4$, $G_1$, G-1-P |
| G | $^{14}$C-Grenzdex-trin + $PO_4^{3-}$ | P.c. | + | GD, $G_n$, $G_4$, $G_1$, |
| H | $^{14}$C-G-1-P | P.c. | + | G-1-P, Gly |

n.b. = nicht bestimmbar; P.c. = Papierchromatographie
GD = Phosphorylase-Grenzdextrin, Gly = Glykogen, $G_n$ = höherkett
Maltodextrine, $G_4$ = Maltotetraose, $G_1$ = Glucose, G-1-P = Glucos
1-phosphat

Tabelle 3

Tabelle 3: Charakterisierung glykogenabbauender Enzyme im Sphäroplastenlysat von A. nidulans

200 ml einer Chemostatkultur, deren Zellen etwa 1/3 der maximalen Glykogenmenge enthielten, wurden als statischer Kultur für 15 h das Licht entzogen. Die Herstellung von Sphäroplasten erfolgte analog 5.5.4. Nach Zentrifugation (5min, 2000 g), Lysis, einer 2. Zentrifugation (10 min, 10000 g) ergaben sich 5 ml Sphäroplastenlysat. Pro Test wurden davon 0.5 ml eingesetzt, 0.2 ml Substratlösung (10 mg/ml), Endvolumen 1 ml (vgl. 5.5.2.). Die Proben F und G erhielten je 0.05 ml 200 mM Natriumphosphatpuffer, pH 6.5 . Die Inkubationszeit betrug 0.5-2 h unter aseptischen Bedingungen. Danach wurden für die Experimente A und B reduzierende Endgruppen nach Nelson bestimmt und für Experiment C die Extinktion bei 400 nm gemessen. Die Experimente F - H wurden als Doppelbestimmungen ausgeführt, wobei eine Probe jeweils einer Nachbehandlung mit einem Überschuß an alkalischer Phosphatase unterzogen wurde (15 min, 35°C, 5 mM $MgCl_2$). Durch Vergleich mit der unbehandelten Probe konnte Glucose-1-Phosphat als Glucose bestimmt werden. Anschließend wurde eine papierchromatographische Trennung nach der mehrfach-aufsteigenden Methode vorgenommen (n-Butanol: Pyridin:Wasser, 6:4:3, v/v/v). Die Reaktionsprodukte wurden an Hand einer co-chromatographierten (U-$^{14}$C)-Maltodextrin-Mischung identifiziert.

mit radioaktiven Substanzen lassen sich glykogenabbauende Enzymaktivitäten feststellen. Experiment H zeigt durch das Auffinden von (U-$^{14}$C)-Glucose-1-phosphat die Aktivität einer Phosphorylase an. Interessant ist ein Vergleich der Experimente D mit F und E mit G. Eine Inkubation mit $^{14}$C-Glykogen ergibt praktisch keinen Abbau, während in Anwesenheit von Phosphat (neben nicht umgesetzten Glykogen) radioaktiv markierte Maltodextrine mit einer Kettenlänge > 4, Maltotetraose,

Glucose und G-1-P gebildet werden. Dieser Befund ist plausibel, wenn man annimmt, daß die außer Phosphorylase am Abbau beteiligten Enzyme keine große Affinität zu Glykogen, wohl aber zu dessen Abbauprodukten haben. Fehlt Phosphat, kann durch Phosphorylase kein Glykogen abgebaut werden, (wenn man die Menge Phosphat im Sphäroplastenlysat vernachlässigt). Es entstehen auch keine hydrolytischen Abbauprodukte (D). Erst wenn ein Glykogenabbau durch Phophorylase erfolgt, können weitere Enzyme spalten (F). Diese Hypothese läßt sich durch Vergleich der Experimente D mit G stützen: Phosphat hat auf den Abbau des Grenzdextrins keinen Einfluß. Zum einen ist das Grenzdextrin kein Substrat für eine Phosphorylase (G, keine Bildung von Glucose-1-phosphat) zum anderen stellt es ein Abbauprodukt des Glykogens dar und wird von hydrolytischen Enzymen weiter abgebaut (E). Die Analyse der Reaktionsprodukte (D-G) ergibt keine signifikant nachweisbaren Mengen von (U-$^{14}$C)-Maltose und -Maltotriose. Dies läßt vermuten, daß $\alpha$- oder ß-Amylasen am Glykogenabbau nicht wesentlich beteiligt sind. Andererseits werden Glucose, Maltotetraose, höherkettige Maltodextrine und Glucose-1-phosphat gebildet. Das letztere Produkt kann nur durch eine Phosphorylase entstehen, während die anderen Abbauprodukte hydrolytischer Enzyme sind.

An Hand von Tabelle 4 lassen sich weitere Angaben zur näheren Charakterisierung der Enzymaktivitäten gewinnen. Durch Chromatographie mit DEAE-Cellulose wurde das Sphäroplatenlysat in zwei Fraktionsbereiche aufgetrennt: der Durchbruch enthielt das in den Zellen (nach Kultivierung unter Lichtentzug) verbliebene Glykogen, sowie wenig Protein und einen Teil der Phycobiline; im Eluat des Salzgradienten fand sich der Haupt-

| Exp. | Substrat | Test | Aktivität | | | Nachweis radioaktiver Reaktionsprodukte | Enzym-aktivität |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | Durchbruch | 0-0.5 M NaCl | 0.5-1 M NaCl | | |
| I | Glykogen | reduzierende Endgruppen | - | - | - | | - |
| K | Grenzdextrin | reduzierende Endgruppen | - | + | - | | amylolytisch |
| L | p-Nitrophenyl-glucosid | p-Nitrophenolat | - | + | - | | α-Glucosidase |
| M | G-1-P | Phosphat | + | - | - | | Phosphorylase |
| N | $^{14}$C-Glykogen | P.c. | - | - | - | Gly | - |
| O | $^{14}$C-Grenzdextrin | P.c. | - | + | - | GD, $G_n$, $G_4$, $G_1$ | amylolytisch |
| P | $^{14}$C-Glykogen + $PO_4^{3-}$ | P.c. | + | - | - | Gly, G-1-P | Phosphorylase |
| Q | $^{14}$C-Grenzdextrin + $PO_4^{3-}$ | P.c. | - | + | - | GD, $G_n$, $G_4$, $G_1$ | amylolytisch |
| R | $^{14}$C-G-1-P | P.c. | + | - | - | G-1-P, Gly | Phosphorylase |

P.c. = Papierchromatographische Trennung

Gly = Glykogen, GD = Phosphorylase-Grenzdextrin, $G_n$= höherkettige Maltodextrine, $G_4$ = Maltotetraose, G-1-P = Glucose-1-phosphat

Legende zu Tabelle 4:
Die Präparation eines Sphäroplastenlysats aus Zellen von A. nidulans erfolgte analog der Prozedur, die unter Tabelle 3 beschrieben ist. 5 ml zentrifugiertes Lysat wurden auf eine DEAE-Cellulose-Säule (1x15 cm), äquilibriert in 50 mM Tris-Maleat-Puffer, pH 6.2, aufgetragen und in zwei Schritten mit 0.5 M und 1 M NaCl in dem gleichen Puffer eluiert. Die Aktivitätsbestimmung erfolgte wie unter 5.5.2. beschrieben. Die Trennung der Reaktionsprodukte ließ sich papierchromatographisch erreichen mit n-Butanol:Pyridin:Wasser (6:4:3, v/v/v) als Laufmittel. Die Proben wurden zuvor zur Entsalzung über eine Biogel P 2-Säule (2 ml) gegeben und am Rotavapor auf 0.1 ml eingeengt. Die Identifizierung der Reaktionsprodukte erfolgte durch Co-chromatographie einer Maltodextrinmischung.

teil der Proteine neben Chlorophyll. Durch die Abstufung der NaCl-Konzentration erkennt man, daß Enzymaktivitäten nur im Durchbruch der Säule, sowie im Bereich 0-0.5 M NaCl des Eluates zu finden sind. Durch eine Abtrennung der gefärbten Substanzen ist eine spektralphotometrische Bestimmung von reduzierenden Endgruppen, p-Nitrophenolat und Phosphat möglich (I-M). Amylolytische Aktivität ergibt sich im Bereich 0-0.5 M NaCl nur bei Inkubation mit dem Phosphorylase-Grenzdextrin (K), während Glykogen als Substrat keine nachweisbaren Mengen reduzierender Endgruppen freisetzt (I). Dieser Befund stimmt mit den radiochemischen Experimenten (D, E) in Tabelle 3 überein. Ferner ist ein direkter Vergleich der Bestimmung reduzierender Endgruppen (I, K, Tabelle 4) mit der Analyse der Reaktionsprodukte möglich (N,O). Dabei fällt auf, daß keine durch Amylasen hervorgerufenen Abbauprodukte nachweisbar waren. Experiment L läßt die Aktivität einer $\alpha$-Glucosidase im NaCl-Eluat erkennen, während Phosphorylase (M, P, R) nur im Durchbruch der Säule zu finden war, wo auch das

zelleigene Glykogen vorhanden ist. Der letztere Befund wies auf einen engen Zusammenhang zwischen Phosphorylase und Glykogen in Form eines Enzym-Substrat-Komplexes hin, der sich für die spätere Reinigung als nützlich erwies.
Vergleicht man die Inkubationen verschiedener Fraktionsbereiche mit $^{14}$C-Glykogen in An- und Abwesenheit von Phosphat, so ergibt sich erneut ein Hinweis auf die oben erwähnte Vermutung, daß ein hydrolytischer Abbau von Glykogen vorzugsweise erfolgt, wenn Abbauprodukte durch Phosphorylase vorliegen. Phosphorylaseaktivität ist im Durchbruch vorhanden (M, R), in Abwesenheit von Phosphat sind aber keine weiteren Abbauprodukte nachweisbar (N). In Anwesenheit von Phosphat (P) wird im Durchbruch Phosphorylase gefunden; im Bereich 0-0.5 M NaCl sind jedoch keine hydrolytischen Aktivitäten nachweisbar, obwohl entsprechende Enzyme mit dem Grenzdextrin aktiv sind (K,O). Offensichtlich führt eine Abtrennung der Phosphorylase (gleichbedeutend mit einer Unterdrückung des phosphorylytischen Glykogenabbaues in Experiment D, Tabelle 3) dazu, daß andere Enzyme Glykogen nicht schnell abbauen können. Die Reaktionsprodukte der Experimente O und Q (Tabelle 4) zeigen keine Unterschiede zu den entsprechenden Inkubationen mit dem Sphäroplastenlysat. Das Phosphorylase-Grenzdextrin wird in beiden Fällen hydrolytisch abgebaut.

Als vorläufige Zusammenfassung läßt sich eine Eingrenzung von Enzymen des α-Glucanabbaues in A. nidulans nach Zahl und Art durch einen Vergleich der Reaktionsprodukte (Tabelle 3 und 4) mit Produkten bekannter enzymatischer Reaktionen (vgl. Fig.1) durchführen: Das Auffinden von Glucose-1-phosphat nach Inkuba-

tion mit Glykogen in Anwesenheit von Phosphat, deutet auf die Aktivität einer Phosphorylase hin (vgl. Fig.1 b,c); fehlende Abbauprodukte wie Maltose und Maltotriose nach Inkubation mit Glykogen bzw. dem Phosphorylase-Grenzdextrin lassen auf keine signifikanten Aktivitäten von α- oder ß-Amylase schließen (vgl. Fig.1 a); die Entstehung von Maltodextrinen beim Abbau von Glykogen zeigt die Aktivität einer 1,6-α- Hydrolase vom Typ eines debranching enzymes (vgl. Fig. 1 a); das Auffinden von Glucose, bzw. die Spaltung von p-Nitrophenyl-Glucosid deuten auf die Aktivität einer α-Glucosidase hin (vgl. Fig.1 d).

## 6.4. Vorversuche zur Isolierung des Phosphorylase-Komplexes aus A. nidulans

Nachdem eine Eingrenzung der am Glykogenabbau beteiligten Enzyme vorgenommen worden war, galt es für die Reinigung eines dieser Proteine, dasjenige zu wählen, von dem man eine Regulationsfunktion innerhalb der katabolen Sequenz erwarten konnte. Die Isolierungsprozedur sollte nach Möglichkeit so ausgelegt werden, daß im Zuge einer Aufarbeitung eine Abtrennung anderer, am Glykogenabbau beteiligter Aktivitäten, vorgenommen werden konnte.
Ausschlaggebend für die Isolierung der Phosphorylase war die Beobachtung, daß das Enzym in vivo offenbar als Glykogenkomplex vorliegt, was zum einen die Reinigung wesentlich erleichtert, zum anderen nach den unter 6.3. geschilderten Experimenten auf eine Regulationsfunktion hoffen läßt.

Für die Reinigung des Enzymkomplexes wurden die Zellen in die Phase der Glykogenmobilisierung versetzt und beim Zellaufschluß, anstelle drastischer Methoden, eine Präparation von Sphäroplasten vorgenommen. Die Zusammensetzung des Extrusionmediums mußte bezüglich pH-Wert, EDTA-Konzentration, Lysozymmenge und der Zeitdauer der Prozedur zuvor optimiert werden. Die Ausbeute an Sphäroplasten ließ sich im Phasenkontrastmikroskop verfolgen. An Hand weiterer Vorexperimente zeigte sich, daß die Abtrennung des Glykogen-Komplexes von Protein und gefärbten Substanzen mit Hilfe von DEAE-Cellulose möglich ist. Dazu mußte der Ionenaustauscher bezüglich Ionenstärke und pH-Wert des Äquilibrierungspuffers in einem engen Bereich eingestellt werden. Als günstigste Kombination ergab sich ein 50-70 mM Tris-Maleat-Puffer, pH 6.2-6.5. Liegt die Molarität des Puffers unterhalb dieses Bereichs, finden offenbar Wechselwirkungen zwischen der Phosphorylase und dem Austauschermaterial statt, so daß der Gesamtkomplex als diffuse Zone mit einem Großteil der Phycobiline wandert. Eine höhere Ionenstärke führt zu einer Vergrößerung der Wanderungsgeschwindigkeit gefärbter Substanzen (Chlorophyll), die deshalb zusammen mit Glykogen im Durchbruch erscheinen. Letzteres beobachtet man auch bei einem pH-Wert $> 6.5$. Aus den Vorversuchen ergab sich die in Fig.14 dargestellte Isolierungsprozedur.

### 6.4.1. Reinigung des Phosphorylase-Glykogen-Komplexes

**Präparation des Sphäroplastenlysats**

Die Zellsuspension wurde einem Chemostaten mit folgenden Kulturparametern entnommen: Volumen des Gefäßes, 1 l; Beleuchtungs-

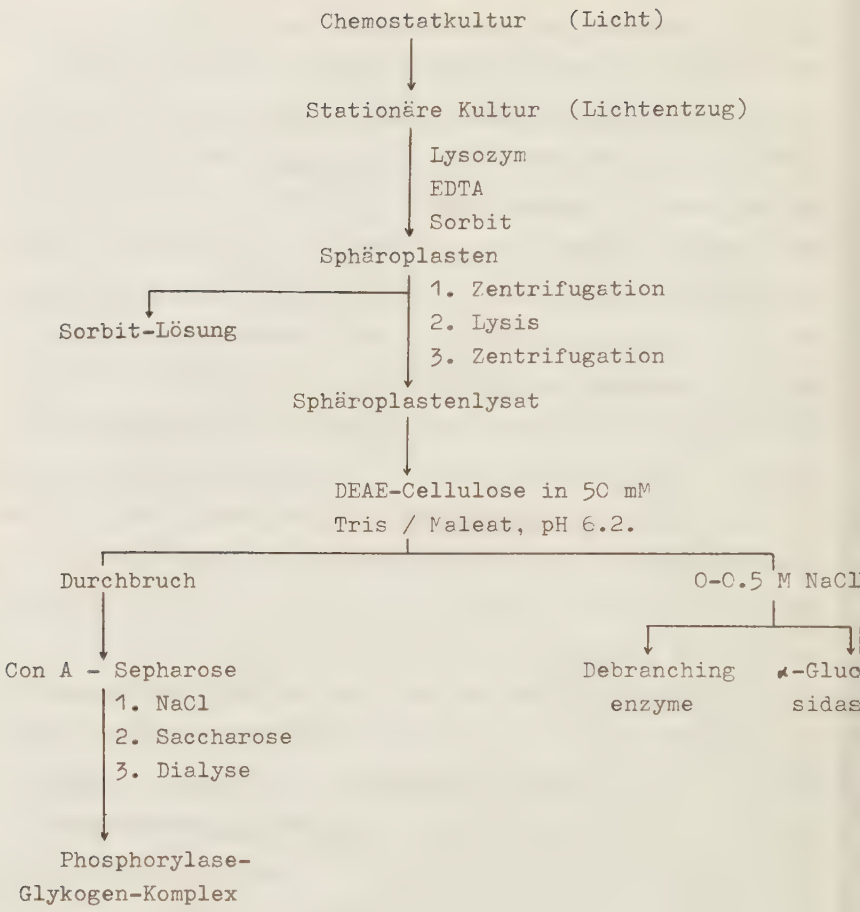


Fig. 14 Schema für die Isolierung des Phosphorylase-Glykogen-Komplexes aus A. nidulans

intensität, 10000 lx; Schichtdicke der Zellsuspension, 5 cm; Begasung, Luft + 1 Vol.% $CO_2$, 60 l/h; Medium, stickstoffdefizient, 0.3 g $KNO_3$/l; Verdünnungsrate, 0.02-0.04 $h^{-1}$. Unter diesen Bedingungen findet eine Glykogenakkumulierung in den Zellen statt.

2.5 l einer kontinuierlichen Kultur wurde unter stationären Bedingungen für 15 h das Licht entzogen und durch Zugabe von Sorbit-Lösung in Sphäroplasten überführt. Nach Zentrifugation bei Zimmertemperatur (5 min, 5000 g) wurden die Sphäroplasten in Tris-Maleat-Puffer, pH 6.2 suspendiert (10 ml) und zum Lysieren einige min. heftig geschüttelt, wobei die Viskosität (DNA) sprunghaft ansteigt. Zur Herabsetzung der Viskosität folgte eine zweimalige Behandlung mit 100 atm $N_2$ in der Yeda press bei 0 °C. Vegetative Zellen wurden unter diesen Bedingungen nicht aufgeschlossen. Anschließend wurde zentrifugiert (10 min, 10000g), das Sediment in Puffer resuspendiert (10 ml) und die gleiche Prozedur wiederholt. Nach Zentrifugation wurde das Sediment schließlich in 5 ml suspendiert und zentrifugiert. Die vereinigten Überstände bildeten das Sphäroplastenlysat und enthielten alle löslichen Proteine, einen Teil der gefärbten Substanzen, sowie den Glykogen-Enzym-Komplex. Im (verworfenen) Sediment waren weniger als 10 % der Phosphorylaseaktivität zu finden.

Chromatographie an DEAE-Cellulose

Das Sphäroplastenlysat wurde auf eine Säule (3 x 30 cm), äquilibriert mit 50 mM Tris-Maleat-Puffer, pH 6.2, aufgetragen und mit einem linearen Gradienten 0-0.5 M NaCl eluiert. Das Elutionsprofil ist in Fig.15 dargestellt. Glykogen und Phosphory-

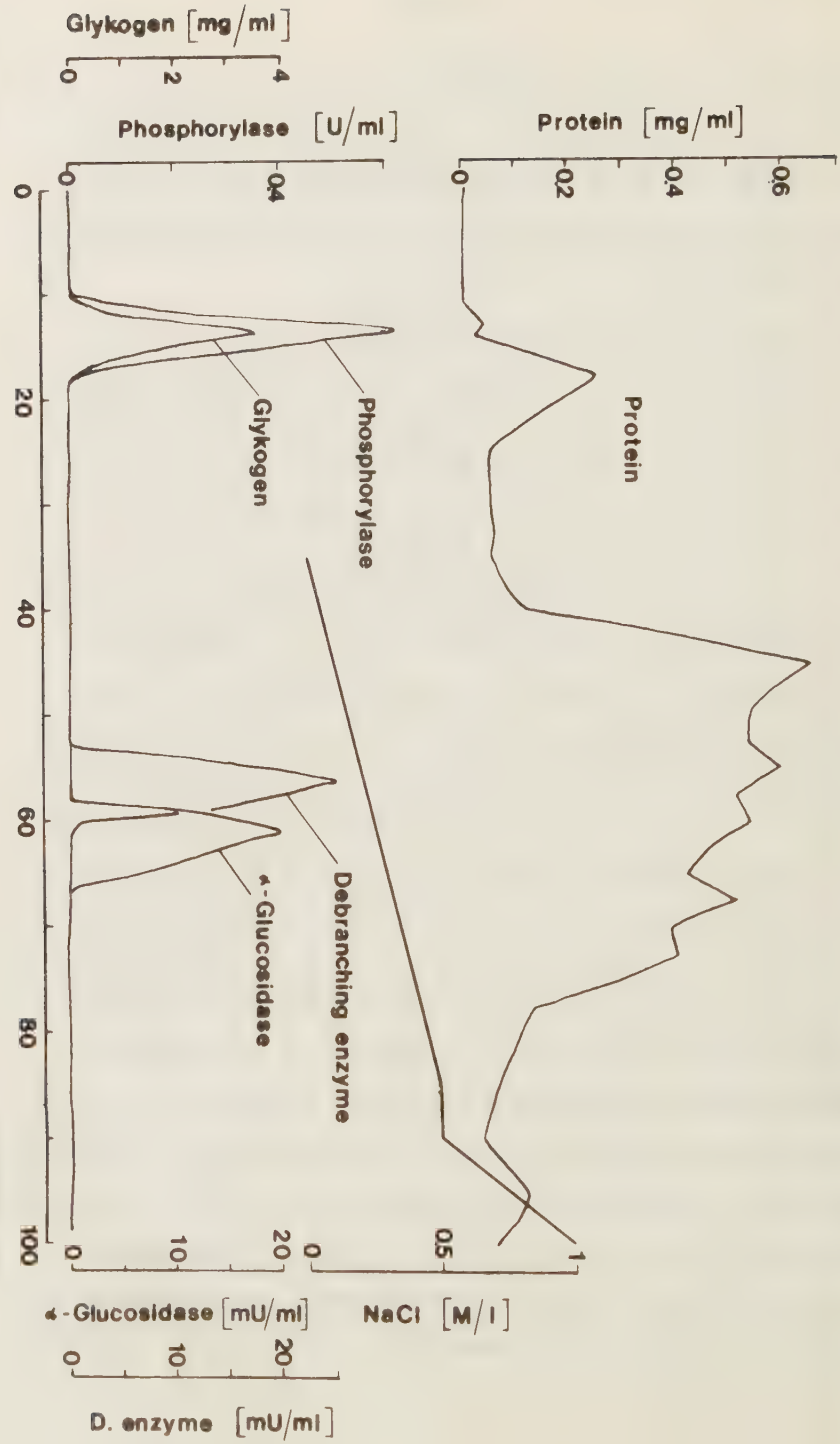
Glykogen [mg/ml]
0
2
4
Phosphorylase [U/ml]
0
0.4
Protein [mg/ml]
0
0.2
0.4
0.6
Protein
Glykogen
Phosphorylase
Debranching enzyme
α-Glucosidase
0
20
40
60
80
100
Fraktions Nr.
0
10
20
α-Glucosidase [mU/ml]
0
10
20
D. enzyme [mU/ml]
0
0.5
1
NaCl [M/l]

Fig. 15

lase finden sich im stark opaleszierenden Durchbruch der Säule. Die entsprechenden Fraktionen wurden vereinigt (30 ml) und für die weitere Reinigung der Phosphorylase verwendet. Bei diesem Schritt konnten mehr als 95 % der Proteine, sowie alle gefärbten Substanzen mit Ausnahme eines geringen Anteils an Phycobilinen abgetrennt werden. Der Bereich des NaCl-Gradienten wurde mit Phosphorylase-Grenzdextrin und p-Nitrophenylglucosid als Substrate für ein debranching enzyme bzw. eine α-Glucosidase getestet. Dabei ergaben sich zwei Aktivitätsmaxima zwischen 0.2-0.3 M NaCl. Eine weitere Anreicherung beider Enzyme wurde nicht vorgenommen. Nach Vereinigen der entsprechenden Fraktionen betrug die spezifische Aktivität 0.05 U/mg (debranching enzyme) und 0.04 U/mg (α-Glucosidase).

Affinitätschromatographie mit Con A-Sepharose

Das glykogenhaltige Eluat der DEAE-Cellulose-Säule wurde in Gegenwart von 1 mM $MnCl_2$ und 1 mM $CaCl_2$ mit 8 g Con A-Sepharose (Feuchtgewicht) über Nacht bei 4 °C geschüttelt, anschließend

Fig. 15 Reinigung des Phosphorylase-Glykogen-Komplexes auf einer DEAE-Cellulose-Säule

Der Ionenaustauscher (150 ml) war mit einem 50 mM Tris-Maleat-Puffer, pH 6.2, äquilibriert worden. Die Laufgeschwindigkeit betrug 45 ml/h, das Volumen der Fraktionen 5 ml.

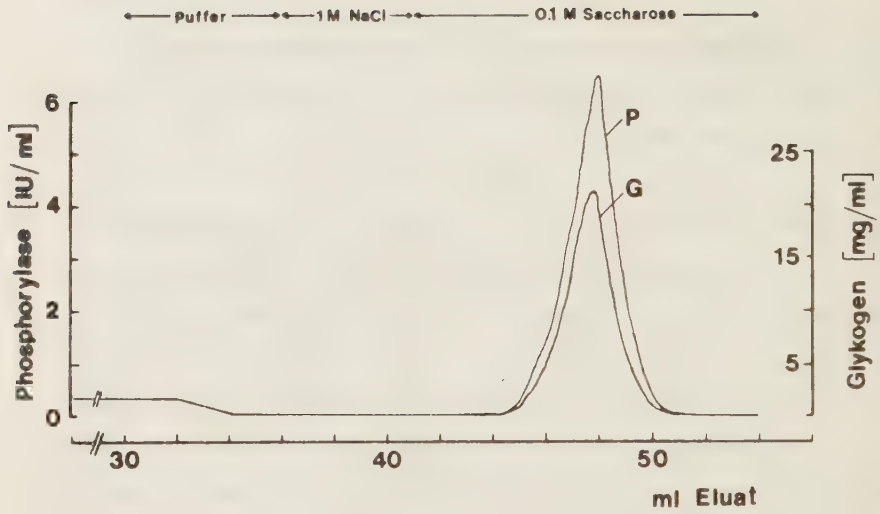


Fig.16 Elutionsprofil der Con A-Sepharose-Säule

Der Glykogenkomplex wurde im batch-Verfahren an Con A-Sepharose gebunden, und das Material anschließend in eine Säule gefüllt (1x20 cm). Die Entfernung unspezifisch anhaftender Proteine erfolgte durch Waschen mit 1 M NaCl in 50 mM Tris-Maleat-Puffer, pH 6.2 (5 ml). Der Enzymkomplex wurde mit 0.1 M Saccharose im gleichen Puffer eluiert. Das Volumen der Fraktionen betrug 1 ml, die Laufgeschwindigkeit der Säule 15 ml/h.

G = Glykogen; P = Phosphorylase

in eine Säule gefüllt und mit 1M NaCl gewaschen. Bei Verwendung von frisch hergestelltem Affinitätsmaterial läßt sich das Glykogen praktisch quantitativ an Con A binden. Die Abtrennung des Enzymkomplexes erfolgte mit 0.1 M Saccharose. Das Elutionsprofil ist in Fig.17 dargestellt. Phosphorylase enthaltende Fraktionen (5 ml) wurden vereinigt und über Nacht gegen 10 mM Tris-Maleat-Puffer, pH 6.2, bei 4 °C dialysiert.

Tabelle 5 gibt eine Zusammenfassung über die Isolierungsprozedur. Das Enzym konnte bis zu einer spezifischen Aktivität von 48.3 U/mg angereichert werden. Zur Aufbewahrung läßt sich der Phosphorylase-Glykogen-Komplex mehrere Wochen bei -15 °C lagern, wobei ein Aktivitätsverlust von weniger als 10 % eintrat.

Als Kriterium für die Reinheit des Enzymkomplexes diente zum einen der Nachweis, daß keine amylolytischen Aktivitäten mehr in der Präparation vorhanden waren, zum anderen die Untersuchung mit Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen (SDS). Die Abwesenheit amylolytischer Aktivitäten konnte sichergestellt werden durch Inkubation der Enzymlösung mit (U-$^{14}$C)-Glykogen und (U-$^{14}$C)-Phosphorylase-Grenzdextrin als Substraten und anschließender papierchromatographischer Trennung eventuell entstandener Reaktionsprodukte. Mit dieser Methode ließen sich keine $^{14}$C-markierten Abbauprodukte nachweisen.

Eine Behandlung des Enzymkomplexes mit SDS (1 % w/v) und Merkaptoäthanol (1 % v/v) für 3 min. bei 100°C führte zu einer teilweisen Solubilisierung der Phosphorylase. Eine anschließende Polyacrylamid-Gelelektrophorese in Gegenwart von SDS (zylindrische Gele, 5 %ig) ergab eine Bande bei der Anfärbung von

| Präparation | Vol (ml) | Gesamtmenge | | | Spez. Aktivität (IU/mg) | Reinigungs-faktor | Ausbeute (%) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Protein (mg) | Glykogen (mg) | Aktivität (IU) | | | |
| Sphäroplasten | 2500 | n.b.[a] | n.b. | n.b. | - | - | - |
| Sphäroplasten-lysat | 25 | 180 | 60.5 | 17.3 | 0.1 | 1 | 100 |
| DEAE-Cellulose-Durchbruch | 30 | 1.6 | 55.5 | 15.4 | 9.6 | 96 | 89 |
| Con A-Sepharose Eluat (nach Dialyse) | 5 | 0.3 | 52.5 | 14.5 | 48.3 | 483 | 84 |

[a]n.b. = nicht bestimmt

Tabelle 5: Zusammenfassung der Isolierung des Phosphorylasekomplexes aus A. nidulans

Protein mit Coomassie Blau. Zur Kontrolle wurde mit einem weiteren Gel eine Anfärbung auf Kohlenhydrat mit dem Schiff-Reagenz vorgenommen. Dabei zeigte sich, daß die Proteinbande nicht frei von Kohlenhydrat (Glykogen) war, so daß die SDS-Elektrophorese zwar als Kriterium für die Reinheit, nicht aber zur Molmassenbestimmung der Phosphorylase herangezogen werden konnte.

6.4.2. Eigenschaften der gereinigten Phosphorylase

Zur Bestimmung der pH-Abhängigkeit wurde das Enzym zum einen aus Zellen isoliert, die für 17 h unter Lichtentzug kultiviert worden waren, zum anderen diente eine belichtete Chemostatkultur als Quelle. Die pH-Abhängigkeit der Enzymreaktion ist in Fig.17 dargestellt. Es zeigte sich, daß das pH-Optimum der Phosphorylase unterschiedlich ist für Zellen, die unter Lichtentzug bzw. in Gegenwart von Licht kultiviert worden waren. Der optimale pH in vitro betrug 6.2 (Lichtentzug) und 5.5 (Licht).

Der Einfluß von Temperatur und Metallionen auf die Phosphorylaseaktivität ist in Fig.18 und Tabelle 6 dargestellt. Die Zellen waren zuvor unter Lichtentzug kultiviert worden. Eine Wiederholung der Experimente mit belichteten Zellen erbrachte keine erkennbare Abhängigkeit dieser Parameter von der Vorbehandlung der Kultur. Das Temperaturoptimum der Phosphorylase liegt in dem Bereich, wo auch die Kultivierung des Organismus erfolgt (40 °C). Eine signifikante Beeinflussung der Enzymaktivität durch die verwendeten Metallionen war nicht zu beobachten.

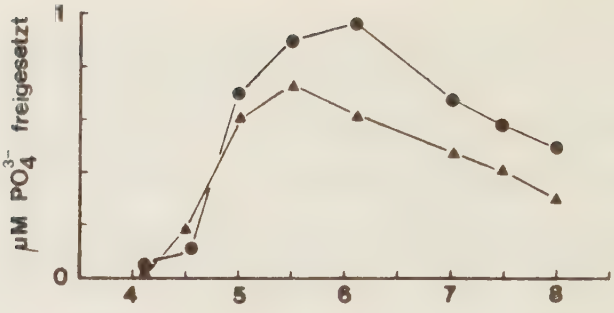


Fig. 17

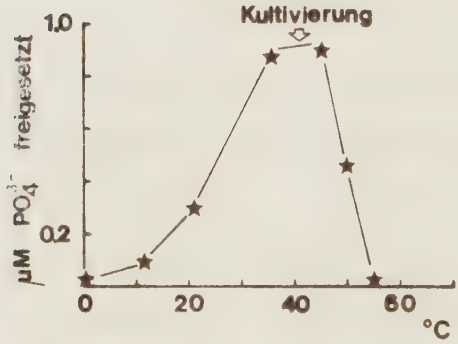


Fig. 18

| Ion | Aktivität µM $PO_4^{3-}$ |
|---|---|
| – (Kontrolle) | 0.47 |
| $Na^+$ | 0.46 |
| $K^+$ | 0.46 |
| $Mn^{++}$ | 0.46 |
| $Fe^{2+}/Fe^{3+}$ | 0.47/0.46 |
| $Ca^{++}$ | 0.47 |
| $Mg^{++}$ | 0.48 |
| EDTA | 0.46 |

Tabelle 6

Fig.17 pH-Abhängigkeit der Phosphorylaseaktivität

500 ml einer Chemostatkultur wurde für 17 h das Licht entzogen, während weitere 500 ml im Licht verblieben. Die Isolierung des Enzymkomplexes erfolgte analog 6.4.1. Zur Bestimmung der pH-Abhängigkeit setzte sich die Testinkubation aus 0.15 ml Enzymlösung, 0.05 ml Glucose-1-phosphat-Lösung (50 mg/ml) und 0.3 ml Puffer zusammen. Verschiedene pH-Werte wurden mit folgenden Puffern erhalten: 250 mM Natriumacetat, pH 4.0-5.5; 250 mM Tris-Maleat, pH 6.0-8.0. Die Inkubationszeit betrug 30 min. (Lichtentzug), bzw. 45 min. (Licht). Die Bestimmung des freigesetzten Phosphats erfolgte spektralphotometrisch bei 560 nm (vgl.5.5.2.).

Fig.18 Temperaturabhängigkeit der Phosphorylaseaktivität

Die Isolierung des Phosphorylase-Glykogen-Komplexes erfolgte aus 500 ml Chemostatkultur (16 h Lichtentzug) analog 6.4.1. Für die Bestimmung der Temperaturabhängigkeit enthielt der Testansatz 0.15 ml Enzymlösung, 0.3 ml 50 mM Tris-Maleat-Puffer pH 6.2 (15 min. Vorinkubation bei verschiedenen Temperaturen); die Reaktion wurde durch Zugabe von 0.05 ml Glucose-1-phosphat-Lösung (50 mg/ml) gestartet und nach 30 min. die freigesetzte Menge an Phosphat bei 560 nm bestimmt.

Tabelle 6: Einfluß von Metallionen auf die Aktivität von Phosphorylase

Der Testansatz enthielt 0.15 ml Enzymlösung aus der gleichen Quelle, die zur Bestimmung der Temperaturabhängigkeit verwendet wurde, 0.25 ml 50 mM Tris-Maleat-Puffer pH 6.2 und Lösungen (0.05 ml) verschiedener Metallionen, so daß eine Endkonzentration von 3 mM erreicht wurde. Das Anion war in allen Fällen Chlorid. Die Vorinkubation erfolgte für 15 min., 35 °C. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0.05 ml G-1-P (50 mg/ml) gestartet und nach 15 min. die freigesetzte Menge an Phosphat bei 560 nm bestimmt.

6.4.3. Experimente zur Trennung des Phosphorylase-Glykogen-Komplexes

Eine Voraussetzung zur Gewinnung molekularer Daten über Phosphorylase (Molmasse, isoelektrischer Punkt, Aminosäurezusammensetzung ) wäre eine Solubilisierung des Enzyms von Glykogen. Dazu wurden eine Reihe von Experimenten unternommen, die sich in zwei Kategorien einteilen lassen:

a) der Enzymkomplex wurde über Glykogen an Con A-Sepharose gebunden, und der Versuch unternommen, Phosphorylase durch Waschen mit verschiedenen Agentien abzulösen, während Glykogen auf der Säule verbleibt.

b) der Enzymkomplex lag in löslicher Form vor und es wurde versucht, Glykogen mit geeigneten Mitteln abzubauen.

Die zu a) durchgeführten Versuche sind in Tabelle 7 zusammengefaßt. Ausgehend von 500 ml Chemostatkultur (15 h Lichtentzug), wurde der Enzymkomplex wie unter 6.4.1.beschrieben isoliert und im Verlauf der Reinigung an Con A-Sepharose gebunden. Je 1.5 ml wurden in einer Pasteurpipette mit 5 ml Tris-Maleat-Puffer bei 0 °C gewaschen (Entfernung nicht adsorbierten Glykogens) und anschließend entsprechend Tabelle 7 behandelt. Im fraktionierten Eluat erfolgte ein Test auf Phosphorylaseaktivität. Zur Kontrolle wurde Glykogen im Anschluß an den Solubilisierungsversuch mit Saccharose von der Con A-Sepharose gewaschen und auf Phosphorylase-Restaktivität getestet (Experiment A, Tabelle 7).

Der Phosphorylase-Glykogen-Komplex erwies sich stabil gegenüber Waschen mit 0.3 - 1 M NaCl, pH 6.2, sowie mit 1 M NaCl, pH 4 - 7 (B, C). Bei pH-Werten < 4.5 trat ein irreversibler

| Exp. | Prodzedur | Seph.-Con A-Glykogen-$\downarrow$-Phosphorylase[a] | Seph.-Con A-$\downarrow$-Glykogen-Phosphorylase[a] |
|---|---|---|---|
| A | 0.1 M Saccharose | - | + |
| B | 1. 0.3-1 M NaCl, pH 6.2 | - | - |
| | 2. 0.1 M Saccharose | - | + |
| C | 1. 1 M NaCl, pH 4.0-7.0[b] | - | - |
| | 2. 0.1 M Saccharose | - | + |
| D | 1. Maltodextrine, 0.1 % 1 M NaCl | - | - |
| | 2. 0.1 M Saccharose | - | + |
| E | 1. Maltodextrine 0.5 - 1 % | - | + |
| | 2. 0.1 M Saccharose | - | - |
| F | 1. 10 mM EDTA | - | - |
| | 2. 0.1 M Saccharose | - | + |
| G | 1. 100 mM Phosphat[c] | ? | - |
| | 2. 1 M NaCl | | |
| | 3. 0.1 M Saccharose | - | + |

a) Der Pfeil zeigt die versuchte Trennung des Sepharose- Con A-Glykogen-Phosphorylase-Assoziates an

b) Zur Phosphorylasebestimmung wurde auf pH 6.2 umgepuffert

c) Das Eluat wurde zur Entfernung von Phosphat dialysiert

Tabelle 7: Experiment zur Ablösung von Phosphorylase
Der Glykogen-Phosphorylase-Komplex wurde im Verlauf der Reinigung an Con A-Sepharose gebunden (vgl. 6.4.1.), in eine Pasteurpipette gefüllt (1.5 ml) und mit 5 ml Tris-Maleat-Puffer, pH 6.2, bei 0 °C gewaschen. Anschliessend wurde die angegebene Prozedur durchgeführt, das Eluat fraktioniert (0.5 ml) und auf Phosphorylase getestet (vgl. 5.5.2.). Danach folgte die Abtrennung des Glykogens mit 0.1 M Saccharose (3 ml) und die Bestimmung der Restaktivität. Für Experiment G wurde die Con A-Sepharose (5 ml) nach dem Waschen

in 10 ml 100 mM Natriumphosphatpuffer pH 6.2 suspendiert, 0.5 - 3 h bei 35 °C geschüttelt, in eine Säule (1x10 cm) gefüllt und wie oben verfahren. Das Eluat mußte zur Entfernung von Phosphat dialysiert werden.

Aktivitätsverlust ein. Überraschenderweise ließ sich das Enzym nicht mit Maltodextrin-Lösungen solubilisieren (D, E), obwohl von bakterieller (und pflanzlicher) $\alpha$-Glucan-Phosphorylase Affinität zu Maltodextrinen erwartet werden kann. Konzentrationen > 0.1 M führten dagegen zu einer Ablösung des Gesamtkomplexes von der Con A-Säule. Experiment F zeigt, daß Metallionen offenbar nicht an der Wechselwirkung von Phosphorylase mit Glykogen beteiligt sind. Der Versuch, den Enzymkomplex durch Selbstverdauung zu trennen (G), läßt sich nicht eindeutig interpretieren. Diesem Versuch lag die Überlegung zugrunde, daß Phosphorylase in Gegenwart von Phosphat Glykogen bis zum Grenzdextrin abbaut, zu diesem Substrat selbst keine große Affinität besitzt und deshalb mit Salzlösungen ablösbar wäre. Der Glykogenabbau in vitro läßt sich feststellen: nach Inkubation mit Phosphat (3 h) wurde mit NaCl gewaschen, das Eluat dialysiert und verbliebenes Glykogen mit Saccharose von der Con A-Säule eluiert. Gegenüber einer Vergleichsprobe nahm die Menge an eluierbarem Glykogen sowie die Phosphorylaseaktivität ab. Man sollte erwarten, daß ein Teil der Phosphorylase abgelöst wurde. Der Test des entsprechenden Eluats ergab jedoch keine Enzymaktivität. Aus diesem Ergebnis läßt sich nicht eindeutig schließen, ob Phosphorylase abgelöst wurde, aber möglicherweise in Abwesenheit von Glykogen instabil ist, oder ob der Aktivitätsverlust während der Inkubationszeit und der anschließenden Dialyse erfolgte.

Nach dem negativen Verlauf dieser Experimente gab es noch die Möglichkeit, Glykogen mit Hilfsenzymen abzubauen. Für diese Versuche lag der Enzymkomplex in löslicher Form vor. Als Hilfsenzyme wurden Amylase (Speichel) in löslicher und immobilisierter Form, sowie Glucoamylase (immobilisiert) eingesetzt. Lösliche α-Amylase konnte verwendet werden, da für dieses Enzym ein Inhibitor vorlag, der in entsprechender Konzentration eine totale Hemmung gewährleistet und in immobilisierter Form die Möglichkeit zur Entfernung des Hilfsenzyms bietet. Zur Durchführung der Experimente wurde 1 ml Enzymlösung (2 mg Glykogen) mit 5 U immobilisierter α-oder Glucoamylase 30 min. bei 35 °C geschüttelt. Zur Kontrolle blieb eine Probe unter den gleichen Bedingungen ohne Hilfsenzym. Zu der Probe mit löslicher α-Amylase wurden anschließend 15 µg Inhibitor (Totalhemmung nach 10 min. Inkubation) zugegeben, während sich die immobilisierten Enzyme in einer Pasteurpipette abtrennen ließen. Nach Dialyse der Proben zur Entfernung der Abbauprodukte wurden Glykogengehalt und Phosphorylaseaktivität bestimmt. In allen drei Fällen ergab sich ein teilweiser Glykogenabbau gegenüber der Kontrolle; die Aktivität der Phosphorylase nahme jedoch um den gleichen Prozentsatz ab, um den der Glykogengehalt verringert worden war. Das gleiche Ergebnis zeigte sich auch nach Verkürzen der Inkubationszeit, Wegfall der Dialyse oder nach Zusatz von 20 Vol.% Glyzerin zur Stabilisierung.
Die durchgeführten Experimente lassen den Schluß zu, daß der Glykogenabbau unter den gezeigten Bedingungen offenbar zu einer Destabilisierung der Phosphorylase führt.

## 6.5. Licht/Dunkel Modulation der Glykogen Phosphorylase

Ausgehend von der Beobachtung, daß Phosphorylase in vivo mit Glykogen assoziiert vorliegt, und darüber hinaus als schrittmachendes Enzym der katabolen Sequenz in Frage kommt, wurde untersucht, ob bei diesem Protein eine regulatorische Funktion erkennbar ist. An Hand physiologischer Befunde läßt sich ableiten, daß ein Licht/Dunkel-Wechsel als auslösendes Signal für die Glykogenmobilisierung zu betrachten ist. In einer Reihe von Vorversuchen wurde deshalb der Phosphorylasespiegel in batch-Kulturen von Anacystis nach Kultivierung in An- und Abwesenheit von Licht bestimmt. Dabei zeigte sich, daß eine Aussage über auffällige Aktivitätsänderungen offenbar als Folge des inhomogenen Zellmaterials nicht möglich war. Um ständig Zellen definierter Zusammensetzung zur Verfügung zu haben, wurde der Organismus deshalb in einem Chemostaten unter Substratlimitierten Bedingungen kultiviert. Alle unter 6.5 beschriebenen Experimente sind mit Zellsuspensionen dieser Kultur durchgeführt worden.

### 6.5.1. Phosphorylasespiegel in vivo während der Kultivierung in An- und Abwesenheit von Licht

Die Existenz eines Turn-overs des Glykogenmoleküls erfordert die Anwesenheit von Enzymen des Abbaues auch unter Bedingungen der Glykogenakkumulierung in der Zelle. Fig.19 zeigt den Gehalt an Phosphorylase in Zellen, die in Gegenwart von Licht kultiviert wurden. Zum Zweck der Glykogensynthese erfolgte

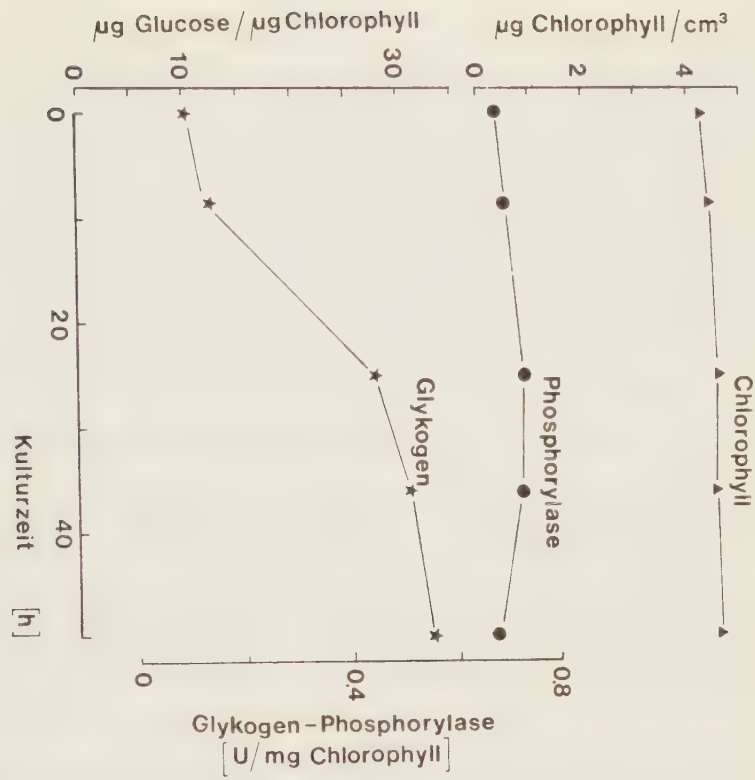
µg Glucose / µg Chlorophyll
µg Chlorophyll / cm³
Chlorophyll
Phosphorylase
Glykogen
Kulturzeit [h]
Glykogen-Phosphorylase [U/mg Chlorophyll]

Fig. 19

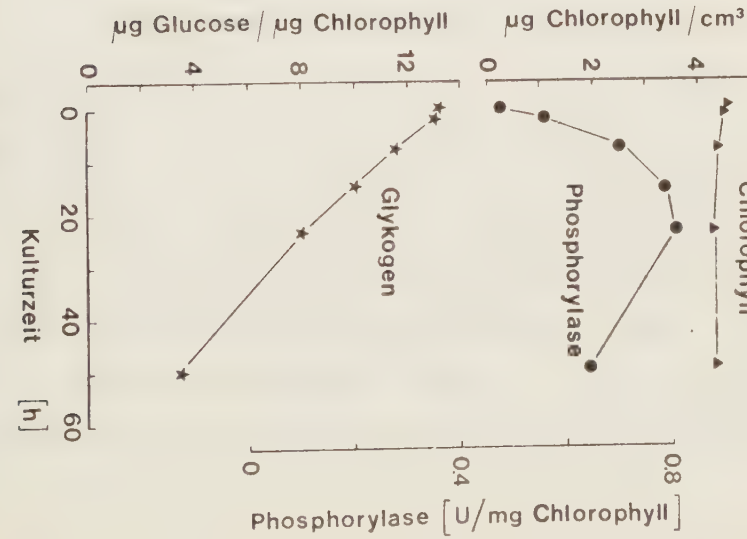
µg Glucose / µg Chlorophyll
µg Chlorophyll / cm³
Chlorophyll
Phosphorylase
Glykogen
Kulturzeit [h]
Phosphorylase [U/mg Chlorophyll]

Fig. 20

Fig.19 Glykogen-Phosphorylaseaktivität und Glykogenakkumulierung während der stationären Phase als batch-Kultur

300 ml Chemostatkultur wurden zentrifugiert (3 min, 1000 g), in 300 ml Nitrat-freiem Medium resuspendiert und in Gegenwart von Licht, Luft und $CO_2$ kultiviert. In verschiedenen Zeitabständen wurden 50 ml Kultur entnommen, zentrifugiert (3 min, 1000 g), in 5 ml Tris/Maleat-Puffer, pH 6.2, suspendiert, 20 s bei 0 °C beschallt, zentrifugiert (5min, 10000 g) und der Gehalt an Phosphorylase, Glykogen und Chlorophyll bestimmt (vgl. 5.5.2. und5.5.3.)

Fig.20 Aktivität der Glykogen-Phosphorylase während des Glykogenabbaues im Dunkeln

300 ml Chemostatsuspension wurden zum Zeitpunkt 0 unter Lichtentzug in Gegenwart von Luft und $CO_2$ stationär weiterkultiviert In verschiedenen Zeitabständen wurden 50 ml entnommen, daraus 5 ml Zellhomogenat präpariert (vgl. Legende zu Fig. 20) und Phosphorylaseaktivität, Glykogen- und Chlorophyllgehalt bestimmt.

eine Überführung in ein Nitrat-freies Medium. Während des Beobachtungszeitraumes blieb die Zelldichte und die Menge an Phosphorylase pro mg Chlorophyll konstant, während der Glykogengehalt in den Zellen zunahm. Die Beeinflussung der Phosphorylaseaktivität durch Licht/Dunkel-Wechsel wird deutlich, wenn man den Enzymspiegel in den Zellen während der Glykogenmobilisierungsphase bestimmt. Zur Durchführung dieser Experimente wurde der Organismus unter Lichtentzug bei sonst gleichen Bedingungen kultiviert (Fig.20). Ensprechend seiner Funktion als Reservekohlenstoffquelle nahm die Menge an Glykogen pro Zelle im Dunkeln ab, während der Chlorophyllgehalt, als Maß für die Zelldichte während des Beobachtungszeitraumes konstant

blieb. Als Folge des Glykogenabbaues verringerte sich sowohl das PCV als auch das Zelltrockengewicht pro ml Kultur. Die Phosphorylaseaktivität wurde deshalb auf den Chlorophyllgehalt der Zellen bezogen. Der Verlauf der spezifischen Enzymaktivität ergab einen Anstieg nach Dunkelstellen der Kultur für ca. 20 h, gefolgt von einem Abfall nach Verringerung des Glykogen-pools in der Zelle.

Die Stimulation der Glykogen-Phosphorylaseaktivität erwies sich als reversibel (Fig.21). Zum Zeitpunkt 1 (Pfeil 1, Fig. 21) wurde eine Chemostatkultur geteilt. Eine Kontrolle verblieb im Licht, währen die Kultivierung des anderen Teils unter Lichtentzug erfolgte. Während der Dunkelphase nahm die spezifische Aktivität der Phosphorylase zu, während sich der Glykogenspiegel in den Zellen verringerte (nicht dargestellt). Zum Zeitpunkt 2 (Pfeil 2, Fig.21) erfolgte eine erneute Teilung der Kultur, wobei eine Kontrolle im Dunkeln verblieb und der andere Teil in Gegenwart von Licht kultiviert wurde. Verglichen mit der Kontrolle erfolgte eine Desaktivierung der Phosphorylase im Verlauf von 10 h im Licht. Der Glykogengehalt der Zellen nahm wieder zu, während die Chlorophyllmenge pro ml Kultur konstant blieb (nicht dargestellt).

Die Ergebnisse aus den Experimenten von Fig.19 bis Fig.21 lassen den Schluß zu, daß offenbar ein direkter Zusammenhang zwischen dem Licht/Dunkel-Wechsel und der Aktivität der Glykogen-Phosphorylase in A. nidulans besteht.

6.5.2. Beeinflussung der Phosphorylaseaktivität durch Inhibitoren

Um mehr Information über den möglichen Mechanismus eines Licht-induzierten Aktivitätswechsels der Glykogen-Phosphorylase zu erhalten, wurde der Einfluß von Inhibitoren der Transkription, Translation und des photosynthetischen Elektronentransportes

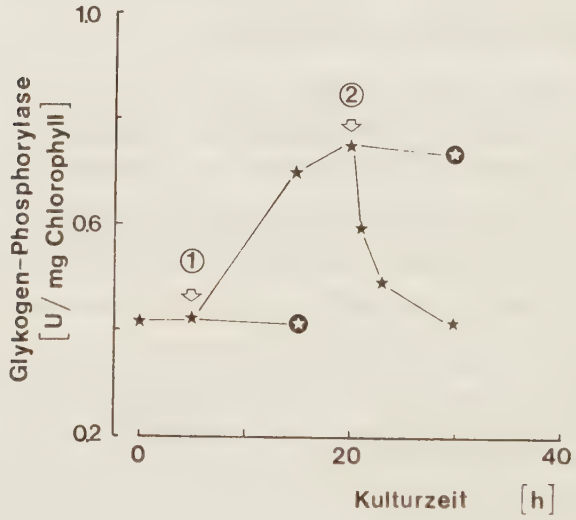


Fig.21 Zeitlicher Verlauf der Aktivierung im Dunkeln bzw. Desaktivierung im Licht von Glykogen-Phosphorylase in vivo.

Zum Zeitpunkt 0 wurden Zellen (1 l) aus dem Chemostaten stationär in Gegenwart von Licht, Luft und $CO_2$ kultiviert. Nach 5 h (Pfeil 1) und 20 h (Pfeil 2) erfolgte eine Teilung der Kultur: einem Teil wurde jeweils das Licht entzogen, der andere verbleib im Dunkeln. Die Bestimmung der Phosphorylaseaktivität ließ sich wie unter Fig.19 vornehmen.
Enzymaktivität der Probe, ★–★; Enzymaktivität der entsprechenden Kontrolle, ✪–✪ .

untersucht. Die Ergebnisse dieser Experimente, zusammen mit den entsprechenden Kontrollen, sind in Tabelle 8 dargestellt. Vor Hinzufügen der Inhibitoren wurden die Zellen im Licht

| | Vor-inkubation I | Vor-inkubation II | Trocken-gewicht (mg/ml) | Glykogen-Phosphorylase (mU/mg TW) |
|---|---|---|---|---|
| A | Licht | Dunkel | 0.28 | 3.3 |
| B | Licht | Licht | 0.36 | 1.8 |
| C | Licht | Dunkel + Chloramphenicol | 0.30 | 3.0 |
| D | Licht | Dunkel + Rifampicin | 0.30 | 3.1 |
| E | Dunkel | Dunkel | 0.30 | 4.3 |
| F | Dunkel | Licht | 0.40 | 2.6 |
| G | Dunkel | Licht + DCMU | 0.28 | 3.9 |

Tabelle 8: Beeinflussung der Lichtmodulation von Glykogen-Phosphorylase durch Inhibitoren

Vorinkubation I (Experimente A - D) bezieht sich auf die Kultivierung von Zellen im Licht unter kontinuierlichen Bedingungen. Vorinkubation I (Experimente E - G): eine Chemostatkultur wurde 15 h unter Lichtentzug stationär kultiviert.
Vorinkubation II: 100 ml Kultur wurden für jedes Experiment aus dem Reservoir der Vorinkubation I entnommen und 6 h unter Begasung wie angegben kultiviert.
Die Konzentration der Inhibitoren betrug: Chloramphenicol, 50 µg/ml; Rifampicin, 70 µg/ml; DCMU, $10^{-5}$ M. Vorinkubation II schloß die Zeit zur Präparation von Sphäroplasten ein (vgl. 5.7.4.). Die Bestimmung der Phosphorylaseaktivität erfolgte entweder im Dunkeln (A-E) oder unter Belichtung mit ca. 2000 lx.

(Vorinkubation I, A-D) oder im Dunkeln (Vorinkubation I, E-G) kultiviert. Die Zugabe der Inhibitoren erfolgte 5 min. nach Wechsel der Kulturbedingungen. Die Stimulation der Glykogen-Phosphorylase im Dunkeln ergab sich aus Experiment A, verglichen mit der Kontrolle B. In Anwesenheit von Chloramphenicol (C) oder Rifampicin (D) erreichte der Phosphorylasespiegel in der Zelle ebenfalls ein Niveau, das der Kontrollkultur (A) im Dunkeln entsprach. Die Abnahme der Phosphorylaseaktivität im Licht (F) verglichen mit Kontrolle E wurde durch 3-(3,4-Dichlorophenyl) 1,1-dimethylharnstoff (DCMU, G) verhindert. Bevor sich entscheiden ließ, ob die Dunkelaktivierung der Glykogen-Phosphorylase durch Chloramphenicol und Rifampicin nicht inhibiert wird, mußte sichergestellt werden, daß diese Inhibitoren im Dunkeln in die Zelle eindringen können. Deshalb wurde in einem Satz von Kontrollexperimenten der Einfluß dieser Inhibitoren auf den Einbau von radioaktiv markiertem L-Leucin in Trichloressigsäure-unlösliches Material im Dunkeln untersucht (Fig.22). Der Einbau von $^{3}$H-Leucin in die Zellen erfolgte in An- und Abwesenheit von Licht ähnlich und wurde von Chloramphenicol und Rifampicin in den Konzentrationen gehemmt, die in den Experimenten C und D (Tabelle 8) Verwendung fanden. Als weitere Kontrolle wurde ein Aliquot der mit Antibiotika behandelten Kulturen in frischem Standardmedium resuspendiert und die Fähigkeit zur Aufnahme normalen Wachstums beobachtet. Dabei ergab sich, daß die lag-Phase solcher Zellen nur wenig über der einer unbehandelten Kultur lag und gleiche Zelldichten erreicht wurden. Aus diesen Resultaten läßt sich schließen, daß für eine Aktivierung der Glykogen Phosphorylase in vivo weder RNA- noch Proteinsynthese eine notwendige Voraussetzung dar-

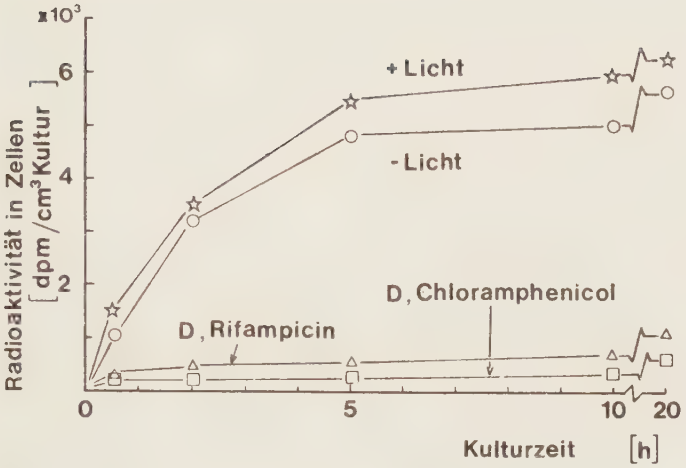


Fig.22 Beeinflussung des $^{3}$H-Leucin-Einbaus in Zellen durch Antibiotika. (D = Kultivierung im Dunkeln)

30 ml Zellsuspension wurden entweder Chloramphenicol (50 µg/ml), Rifampicin (70 µg/ml) oder kein Inhibitor (Kontrolle), sowie 0.1 mM $^{3}$H-Leucin (5 x $10^{4}$ dpm/ml) nach 5 min. zugesetzt. In verschiedenen Zeitabständen wurden Proben entnommen (0.5 ml), mit 3 ml 50 mM L-Leucinlösung versetzt und über Milliporefilter abgetrennt. Die Zellen wurden auf dem Filter mit Wasser gewaschen und die Radioaktivität direkt durch Flüssigkeitsscintillation (8 ml) ermittelt.
Zum Zeitpunkt 0 und nach 10 h wurde eine weitere Probe (3 ml) aus jeder Kultur entnommen und der Einbau von $^{3}$H-Leucin in TCA-unlösliches Material untersucht. Nach Zentrifugation (3 min, 2000 g) wurden die Zellen in 6 ml TCA (Trichloressigsäure, 4%, w/v) suspendiert, beschallt und 15 h bei 4 °C stehengelassen. Nach Zentrifugation (10 min, 10000 g) ließ sich das Sediment mit $H_2O$ waschen, in 10 mM NaOH lösen, neutralisieren und 0.2-0.5 ml zur Bestimmung der Radioaktivität einsetzen.
95 % der Radioaktivität in den Zellen fand sich im Präzipitat mit TCA wieder.
Die Stabilität von Rifampicin wurde im Medium durch Vergleich von Absorptionsspektren (280 - 600 nm) verfolgt. Der Inhibitor war unter den Kulturbedingungen etwa 10 h stabil.

stellen. An der Lichtdesaktivierung des Enzyms ist wahrschein
lich der photosynthetische Elektronentransport beteiligt.

6.5.3. Desaktivierung der Phosphorylase in vitro

Ausgehend von der Beobachtung, daß eine photochemische Deakti
für die Desaktivierung der Phosphorylase in vivo verantwort-
lich sein könnte, wurde untersucht, ob der gleiche Effekt auc
eine durch chemische Modifikation in vitro möglich ist. Die
Resultate einer Reihe von Experimenten sind in Tabelle 9 dar-
gestellt. Zellen aus einer Chemostatkultur, die eine Vorbehan

| Exp. | Vor-inkubation I ganze Zellen 40 °C | Vor-inkubation II Sphäroplasten-lysat, 0 °C | Glykogen-Phosphorylase mU/mg Chl[a)] | Isocitrat-Dehydrogenas mU/mg Protei |
|---|---|---|---|---|
| A | Dunkel | Dunkel | 750 | - |
| B | Dunkel | Licht | 400 | - |
| C | Dunkel | Dunkel + DTT | 260 | - |
| D | Licht | Licht | 410 | - |
| E | Licht | Licht + DTT | 350 | - |
| F | Dunkel | Dunkel | 470[b)] | - |
| G | Dunkel | Dunkel + DTT | 260[b)] | - |
| H | Dunkel | Dunkel | - | 28 |
| I | Dunkel | Dunkel + DTT | - | 27 |
| K | Licht | Licht | - | 29.5 |
| L | Licht | Licht + DTT | - | 30 |

Tabelle 9

Tabelle 9: Desaktivierung von Glykogen Phosphorylase durch Licht und DTT in vitro
a) Chlorophyll
b) Protein konnte in Gegenwart von Glykogen nicht bestimmt werden; die spezifische Aktivität wurde deshalb auf Chlorophyll bezogen, obwohl dieses durch den Reinigungsschritt entfernt worden war.

Am Ende der Vorbehandlung I (Durchführung entspricht der Legende zu Tabelle 8) wurden die Zellen in Sphäroplasten überführt und lysiert (vgl. 5.4.7.). Vorinkubation II bezeiht sich auf die Inkubation des Sphäroplastenlysats (Experimente A-E) für 15 min. bei 0 °C. Die Bestimmung der Phosphorylaseaktivität erfolgte im Dunkeln, bzw. in Anwesenheit von Licht entsprechend Vorinkubation II. Für die Experimente F und G wurde das Sphäroplastenlysat zentrifugiert (5 min, 10000 g) und über eine DEAE-Cellulosesäule, äquilibriert mit 50 mM Tris/Maleat-Puffer, pH 6.2, gegeben. Der Glykogen-Phosphorylasekomplex ließ sich im Durchbruch der Säule auffangen und wurde in An- und Abwesenheit von DTT getestet. Die Endkonzentration betrug in allen Proben 5 mM. Die Belichtung des Sphäroplastenlysats erfolgte wie in Fig.23 angegeben. Zur Bestimmung der NADP-abhängigen Isocitrat Dehydrogenase vgl. 5.5.2.

lung in An- oder Abwesenheit von Licht erfahren hatte, wurden in Sphäroplasten überführt, lysiert und die Modulation der Phosphorylaseaktivität durch Licht oder DTT bestimmt. Um eine maximale Lichtausbeute zu erreichen, wurde die Probe als dünner Film in den Zwischenraum zweier konzentrischer Reagenzgläser gegeben. Die Apparatur ist in Fig.23 dargestellt. Experiment B zeigt, daß eine Belichtung des Sphäroplastenlysats in vitro zu einer Abnahme der spezifischen Phosphorylaseaktivität verglichen mit der Dunkelkontrolle (A) führt. Eine chemische Re-

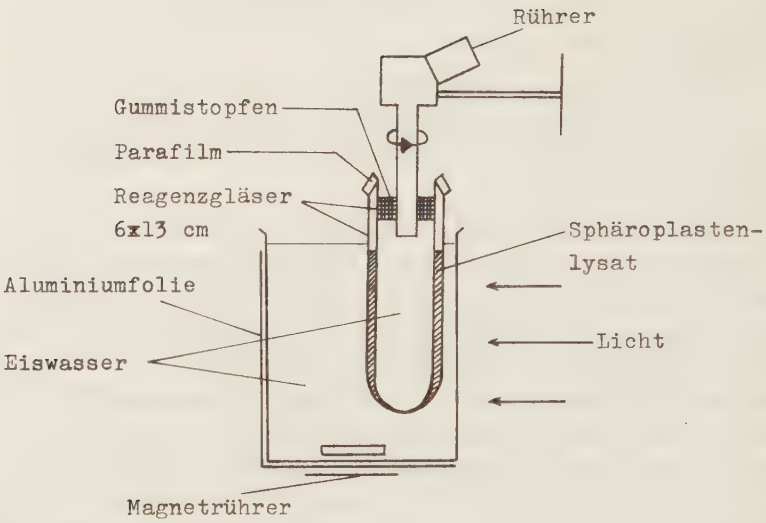


Fig.23 Apparatur zur Belichtung des Sphäroplastenlysats

Das Volumen der zu belichtenden Probe betrug 0.5 ml, die Oberfläche 50 $cm^2$. Zur Belichtung wurden zwei 65 Watt Tageslicht-Neon-Röhren verwendet; der Abstand des Probengefäßes betrug ca. 3 cm, die Rotationsgeschwindigkeit 3 $s^{-1}$. Zur optimalen Lichtausnutzung wurde das Kühlgefäß (200 ml Becherglas) von außen zur Hälfte mit Aluminiumfolie versehen.

duktion (C) des Enzyms im Dunkeln ergab eine stärkere Desaktivierung als die Behandlung mit Licht. Die Experimente D und E gingen von Zellen aus, die direkt einer belichteten Kultur entstammten. Die Reduktion des Sphäroplastenlysats mit DTT (E) zeigte, daß die Phosphorylaseaktivität gegenüber der entsprechenden Kontrolle (D) kaum abnahm.

Die Wiederholung der Experimente A-E mit einem Sphäroplastenlysat, das durch Zentrifugation bei 10000 g von Membranen befreit wurde, ergab die gleichen Resultate (nicht dokumentiert)

Wie unter 6.4.1. beschrieben, ließ sich der Phosphorylase-Glykogenkomplex mit Hilfe von DEAE-Cellulose etwa um einen Faktor 100 (bei Verzicht auf ca. 30 % der Ausbeute um einen Faktor 200) anreichern. Die Reduktion letzterer Präparation mit DTT (G) ergab gegenüber der Kontrolle (F) eine deutliche Desaktivierung des Enzyms.

Eine triviale Erklärung für die Desaktivierung der Phosphorylase in vitro wäre eine Aktivierung unspezifischer Proteinasen durch DTT. Um diese Möglichkeit auszuschließen, wurde der Einfluß des Reduktionsmittels auf die NADP-abhängige Isocitrat Dehydrogenase (H-I) im gleichen Sphäroplastenlysat untersucht. Von diesem Enzym ist nicht zu erwarten, daß es einer Licht/Dunkel-Regulation unterliegt. Für die Experimente wurde DTT in einer Konzentration von 5 mM und 10 mM eingesetzt. Eine signifikante Beeinflussung der spezifischen Enzymaktivität durch Licht/Dunkel-Wechsel (H, K) oder DTT (I, L) war nicht festzustellen. Die Möglichkeit einer generellen Desaktivierung von Enzymen durch DTT muß damit als unwahrscheinlich betrachtet werden.

In Fig.24 ist die Desaktivierung der Phosphorylase durch verschiedene Konzentrationen an DTT im Sphäroplastenlysat, nach Entfernen von Membranen durch Zentrifugation bei 10000 g, sowie nach einer etwa 200-fachen Anreicherung des Enzymkomplexes mit Hilfe von DEAE-Cellulose untersucht, Die Vorinkubationszeit des Enzyms mit dem Reduktionsmittel betrug 15 min. bei 0 °C. Es zeigte sich, daß die Desaktivierung bis 5 mM erreicht werden konnte.

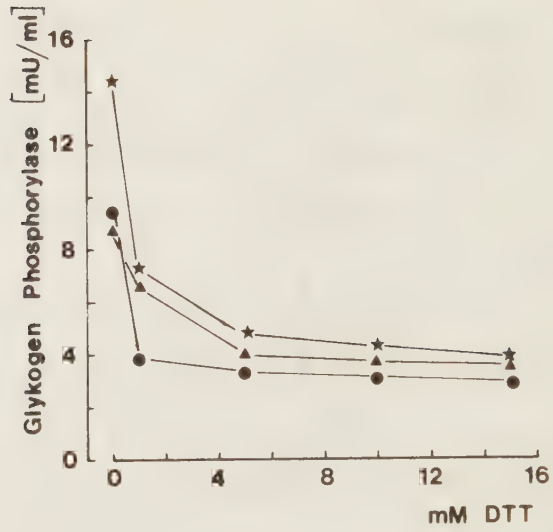


Fig.24 Einfluß der DTT-Konzentration auf die Aktivität der Phosphorylase.

100 ml Chemostatkultur (15 h Lichtentzug) wurden zu 5 ml Sphäroplastenlysat reduziert, zentrifugiert (5 min, 10000g), über eine DEAE-Cellulose-Säule (1 x 10 cm, 50 mM Tris-Maleat-Puffer pH 6.2) gegeben und der Glykogen-Phosphorylase-Komplex im Durchbruch aufgefangen. Verwendung fanden nur solche Fraktionen, die keine Phycobiline enthielten. Die Bestimmung der Phosphorylaseaktivität im Sphäroplastenlysat ★–★, nach Zentrifugation ●–● und im DEAE-Eluat ▲–▲ erfolgte mit dem radiochemischen Test (vgl. 5.5.2.). Die Vorinkubationszeit von Phosphorylase mit DTT betrug 15 min. bei 0 °C, die Inkubationszeit 30 min. (Sphäroplastenlysat) und 20 min. bei 35 °C in den beiden anderen Fällen. Präparation wie Aktivitätbestimmung wurden unter Ausschluß von Licht durchgeführt.

Versuche, die Licht/Dunkel-Modulation der Glykogen-Phosphorylase in vitro mit physiologischen Oxidation- oder Reduktionsmitteln zu erreichen, sind in Tabelle 10 dargestellt. Als Agenz für die Desaktivierung des Enzyms wurde Thioredoxin aus Spinat (in Gegenwart von DTT), für eine mögliche Aktivierung oxidiertes Glutathion eingesetzt. Ausgangsmaterial für die Experimente zur Desaktivierung waren Zellen aus einer Dunkelkultur, die einen hohen Phosphorylasespiegel enthielten, während für die angestrebte Stimulierung der Enzymaktivität Zellen aus einer Lichtkultur mit einem niedrigen Phosphorylaseniveau verwendet wurden. Zur Präparation der Enzymlösung erfolgte die vollständige Reinigung nach 6.4.1. Experiment A (Tabelle 10) zeigt zur Kontrolle die Aktivität der Phosphorylase in einer unbehandelten Probe. Die Anwesenheit von Thioredoxin allein (B) zeigt keinen Einfluß (Fehlen eines Reduktionsmittels), während DTT (C), wie schon erwähnt, eine Desaktivierung zur Folge hat. Thioredoxin in Anwesenheit von DTT sollte eine stärkere Aktivitätsabnahme bewirken (als DTT allein), wenn es als physiologisches Reduktionsmittel in Frage kommt. Die Experimente D und E zeigen, daß mit steigender Konzentration an Thioredoxin (bei gleicher Menge DTT) eine leichte Zunahme der Desaktivierung zu beobachten ist. Die Größe des Effekts läßt indes keine Aussage über die Beteiligung von Thioredoxin an der Modulation der Phosphorylase in vivo zu.

Versuche, die Aktivität des Enzyms durch Oxidation mit Glutathion zu stimulieren, sind in den Experimenten F - M dargestellt. Verglichen mit der Kontrolle (F) zeigt sich eine leichte Aktivitätserhöhung bis zu einer Konzentration von 5 mM, darüber-

| Exp. | Vorbehandlung I Sphäroplasten 40 °C | Vorbehandlung II Enzymlösung 0 °C | Phosphorylase-aktivität (mU/ml) |
|---|---|---|---|
| A | - Licht | - | 33.5 |
| B | - Licht | TR[a] (18 µg) | 33.9 |
| C | - Licht | DTT (0.9 mM) | 18.7 |
| D | - Licht | TR (18 µg) + DTT (0.9 mM) | 17.8 |
| E | - Licht | TR (36 µg) + DTT (0.9 mM) | 17.1 |
| F | + Licht | - | 14.2 |
| G | + Licht | GSSG[b] (0.5 mM) | 14.5 |
| H | + Licht | GSSG (1.0 mM) | 14.8 |
| I | + Licht | GSSG (2.5 mM) | 15.6 |
| K | + Licht | GSSG (5.0 mM) | 18.5 |
| L | + Licht | GSSG (10 mM) | 11.2 |
| M | + Licht | GSSG (15 mM) | 2.5 |

a) Thioredoxin aus Spinat, b) oxidiertes Glutathion

Tabelle 10: Beeinflussung der Phosphorylaseaktivität durch Thioredoxin und oxidiertes Glutathion

Aus 100 ml Chemostatkultur (Licht oder Lichtentzug, vgl. Vorbehandlung I) wurde der Phosphorylase-Glykogenkomplex analog 6.4.1. isoliert.
Vorbehandlung II: Inkubation von Enzymlösung (0.7 ml) mit Lösungen der angegebenen Redox-Mittel (0.01-0.15 ml) für 5-10 min. bei 0 °C . Der Start der Reaktion erfolgte durch Zugabe von 0.1 ml $^{14}$C-G-1-P-Lösung (1 mg, $5 \times 10^4$ dpm, vgl. 5.5.2). Endvolumen: 1 ml, Inkubationszeit: 15 min., 35 °C.

hinaus trat eine drastische Desaktivierung des Enzyms ein. Die Stimulation scheint nicht signifikant zu sein, so daß auf eine Beteiligung von oxidiertem Glutathion bei der Aktivierung der Phosphorylase in vivo nicht geschlossen werden kann.

# 7. Diskussion

## 7.1. Eine neue Methode zur Herstellung $^{14}C$-markierter Kohlenhydrate

Die Präparation von (U-$^{14}C$)-markierter Stärke ist beschrieben worden aus Rüben (Beta vulgans)[54], Tabak[55], Süßkartoffeln[56], Grün- und Rotalgen[57]. Die Isolierungsprozedur beinhaltet in allen Fällen eine Assimilierung von $^{14}CO_2$ in Gegenwart von Licht und die Extraktion der Kohlenhydrate mit Äthanol. Aus dem Rückstand ließen sich vielfach (U-$^{14}C$)-markierte Aminosäuren und Nucleotide gewinnen[58]. Polysaccharide wurden durch saure Hydrolyse abgebaut und die Reinigung der Zucker mit Hilfe von Ionenaustausch- und Papierchromatographie vorgenommen. Nachteile dieser Prozedur sind die unspezifische Isolierung der Kohlenhydrate und die arbeitsaufwendige Reinigung der Abbauprodukte.

Die hier beschriebene Methode geht von löslichem (U-$^{14}C$)-Glykogen (im Gegensatz zu unlöslichen Stärkekörnern) aus und verwendet selektive enzymatische Reaktionen zur Herstellung der Abbauprodukte. Der unspezifischen Extraktion der Kohlenhydrate wird eine spezifische Isolation des Glykogens mit Concanavalin A-Sepharose gegenübergestellt. Die Spezifität des Metalloproteins[59] umfaßt verzweigte Polysaccharide, die α-D-Glucopyranosyl, α-D-Mannopyranosyl- und D-Fructofuranosyl-Endgruppen aufweisen. Neben dem Vorteil einer hohen Reinheit bereits auf der Stufe des Polysaccharids erlaubt die

Affinitätschromatographie auch die Isolierung geringer Mengen von Glykogen in guter Ausbeute. Eine geeignete Manipulation der Kulturbedingungen von A. nidulans läßt die Synthese von Glykogen zu einem Hauptstoffwechselweg werden, wodurch eine hohe spezifische Radioaktivität des α-Glucans erreicht werden kann. Ein höherer Wert, als der hier bestimmte (5 mCi/mMol Glucose) kann durch Verwendung photosynthetischer Apparaturen [54,60,61] erwartet werden, in denen $^{14}CO_2$ unter steady-state Bedingungen assimiliert wird. Obwohl $^{14}$C-markierte D-Glucose und Maltose kommerziell verfügbar sind, erscheint eine Präparation nach der hier beschriebenen Methode sinnvoll, wenn auf große Mengen oder besondere Reinheit Wert gelegt wird. Eine Anwendung $^{14}$C-markierter Maltodextrine wäre für die Erforschung des Maltodextrin-Transportsystems in Pakterien[42] denkbar. Zur Identifizierung der am Glykogenabbau in A. nidulans beteiligten Enzyme wurden in erster Linie (U-$^{14}$C)-Glykogen und das Phosphorylase-Grenzdextrin eingesetzt.

## 7.2 Kultivierung von A. nidulans unter kontinuierlichen Bedingungen

Die physiologischen Eigenschaften einer Chemostatkultur werden durch jene Geschwindigkeit festgelegt, mit der das Wachstumsmedium im Chemostaten verdünnt wird, wobei sich ein stationäres Fließgleichgewicht einstellt, wenn das Medium eine, das Wachstum begrenzende Komponente enthält. Detaillierte Informationen über das Prinzip der kontinuierlichen Kultivierung heterotropher Mikroorganismen sind von

Tempest beschrieben[24], während nur eine geringe Anzahl phototropher Organismen unter Licht-limitierten Chemostatbedingungen gezüchtet wurden[62-64]. Wenig ist indessen über die Kultivierung phototropher Zellen in Substrat-begrenzten Chemostaten bekannt[65].

Für die Untersuchung des α-Glucanabbaues in A. nidulans bestand die Notwendigkeit, Zellen mit einem definierten Glykogengehalt bereitzustellen. Die (bekannten) Kulturparameter[66], die zu einer Glykogenakkumulierung in batch-Kulturen führen, wurden deshalb auf den kontinuierlichen Betrieb übertragen. Die Konstruktion des Chemostaten (vgl. Fig.5) wurde so ausgelegt, daß ein separates Sterilisieren der einzelnen Gefäße möglich war. Das Fernhalten von Kontaminationen - wichtigstes Problem bei jedem Chemostaten - konnte durch Auswaschen der Zellen mit einem ständigen Luftstrom weitgehend erreicht werden. Die Verwendung Nitrat-begrenzter Medien, sowie eine Abstimmung von Volumenwechsel und Lichtintensität ermöglichten es, den Glykogengehalt in den Zellen in einem weiten Bereich zu variieren. Darüberhinaus konnten die Parameter für Wachstum und Glykogensynthese unter Substrat- und Licht-limitierenden Bedingungen bestimmt werden. Durch doppelt reziproke Auftragung der Wachstumsgeschwindigkeit von Zellen unter verschiedenen Kulturbedingungen und dem Nitratgehalt des Mediums ließ sich nach Extrapolation eine maximale Wachstumsgeschwindigkeit für A. nidulans von $\mu_{max} = 0.33\ h^{-1}$ und ein $K_s$-Wert von 0.22 g $KNO_3$/l bestimmen. Der $\mu_{max}$-Wert läßt den Charakter eines Grenzwertes erkennen durch Vergleich mit Verdopplungszeiten von maximal 3 h, die von Carr und Mann

beschrieben sind[67]. Die beobachteten Wachstumsgeschwindigkeiten für den Licht-limitierten Chemostatbetrieb bei Verwendung des Standardmediums (0.02-0.15 $h^{-1}$) liegen im Bereich der Werte, die auch von Slater[68] bestimmt wurden 0.02-0.1 $h^{-1}$).

## 7.3. Charakterisierung von Enzymen des α-Glucanabbaues - Vorschlag eines Stoffwechselschemas

Die systematische Untersuchung von Enzymen, die am Abbau von Glykogen in A. nidulans beteiligt sind, erfolgte an Hand der unter 6.3 und 6.4 beschriebenen Experimente. Durch Vorgabe von Substraten bekannter Struktur konnte nach Inkubation mit entsprechend präparierten Enzymlösungen eine Analyse der Reaktionsprodukte vorgenommen werden. Ausgehend von den Substraten Glykogen und Phosphorylase-Grenzdextrin wurden Glucose, Glucose-1-phosphat, Maltotetraose und höhere Maltodextrine als Abbauprodukte identifiziert (vgl. Tabelle 3 und 4). Eine vorläufige Charakterisierung der Enzyme war unter der Annahme möglich, daß ein Vergleich der identifizierten Reaktionsprodukte mit Produkten bekannter enzymatischer Reaktionen aus dem bakteriellen Glykogenstoffwechsel erlaubt ist (vgl. Fig.1). Die Prämisse ist plausibel unter Hinweis auf eine Analogie zwischen A. nidulans und heterotrophen Bakterien in bezug auf Glykogenakkumulierung und Mobilisierung[66]. Durch Vergleich der Reaktionsprodukte ließen sich eine Phosphorylase, sowie zwei hydrolytische Aktivitäten vom Typ eines debranching enzymes und einer α-Glucosidase erkennen, während

Abbauprodukte charakteristisch für α- oder ß-Amylase nicht nachweisbar waren. Eine weitergehende Charakterisierung konnte nur an Hand homogener Präparationen vorgenommen werden, wobei eine Isolierung aller drei Aktivitäten im Zuge einer Aufarbeitung günstig wäre. Dieses Ziel konnte mit Hilfe von DEAE-Cellulose erreicht werden (vgl. 6.4.). Es zeigte sich, daß Phosphorylase zusammen mit Glykogen von den beiden hydrolytischen Aktivitäten abgetrennt werden konnte, die ihrerseits mit einem NaCl-Gradienten eluierbar waren. Für eine weitere Anreicherung galt es dasjenige Protein zu wählen, von dem man eine Regulationsfunktion innerhalb der katabolen Sequenz erwarten konnte. Die Wahl fiel auf Phosphorylase, da das Enzym als Glykogen-Komplex isolierbar war und die Vermutung bestand, daß die Glykogenmobilisierung von diesem Assoziat ihren Ausgang nahm. Dies wurde auch durch die Beobachtung gestützt, daß die beiden hydrolytischen Enzyme nach den unter 6.3. beschriebenen Experimenten zu phosphorolytischen Abbauprodukten des Glykogens eine größere Affinität zeigten als zu Glykogen selbst.

Die Isolierung von Glykogen-Phosphorylasen ist aus Bakterien[70], Pflanzen[71-73], sowie Hefe-[74] und Säugetierzellen[34] beschrieben worden. Unabhängig von der Art des Ausgangsmaterials erfolgt die Reinigung meistens durch eine Folge ähnlicher Schritte: nach Aufschluß der Zellen und Zentrifugation werden Fremdproteine durch Fällung mit Ammoniumsulfat, saurem pH oder durch Hitzebehandlung abgetrennt; es folgt eine mehrfache Chromatographie mit DEAE-Cellulose und verschiedenen Molekularsieben. Die Prozedur insgesamt ist lang-

wierig und arbeitsaufwendig. Die gefundenen Reinigungsfaktoren für weitgehend homogene Präparationen erreichen Werte bis 1100. Eine elegantere Methode ist von Sørensen und Wang[75] beschrieben. Das Enzym konnte aus menschlichen Leukozyten mit Hilfe von 5' -AMP-Sepharose etwa 2500-fach angereichert werden.

Die hier beschriebene Isolierung der Phosphorylase aus A. nidulans verwendet ebenfalls das Prinzip der Affinitätschromatographie und kommt mit zwei Reinigungsschritten aus. Eine Anreicherung des Enzyms mit den oben erwähnten Fällungsmethoden erübrigte sich, da die Phosphorylase als Glykogenkomplex vorlag und durch Chromatographie mit DEAE-Cellulose wesentlich effektiver von Fremdproteinen abgetrennt werden konnte. Der folgende Schritt (Affinitätschromatographie mit Concanavalin A-Sepharose) ermöglicht die spezifische Isolierung des Enzym-Glykogenkomplexes und führt gleichzeitig nur zu einem geringen Verlust an Gesamtaktivität (vgl. Tabelle 5). Eine Anreicherung der Phosphorylase konnte nach dieser Methode bis zu einer spezifischen Aktivität von 48.3 IU/mg vorgenommen werden; dies entspricht etwa einer 500-fachen Reinigung. Die spezifische Aktivität des homogenen Enzyms liegt im Bereich der Werte, die auch für Phosphorylasen aus anderen Quellen beschrieben sind ( Sweet corn, 49 IU/mg, pH 6.5, 30 °C [71]; Süßkartoffeln, 30 - 35 IU/mg[72]; Mais, 57 IU/mg, pH 5.8, 37 °C [73]; Hefe 63 IU/mg, pH 5.8, 30 °C [74]).

Voraussetzung für eine weitergehende Charakterisierung der Phosphorylase ist eine Solubilisierung des Proteins von Glykogen. Assoziate zwischen Enzymen (Glykogen-Synthase,

Phosphorylase) und Glykogen sind mehrfach beschrieben worden[76,77]. In diesen Fällen war für eine Abtrennung des Enzyms kein besonderer Schritt nötig, da das Kohlenhydrat entweder durch Zentrifugation oder im Verlauf der Reinigung durch Chromatographie mit DEAE-Cellulose ablösbar war. Auch die oben erwähnte Isolierung einer Phosphorylase aus Leukozyten geht von einem Glykogen-Assoziat aus, wobei eine Abtrennung des Polysaccharids durch Waschen der Affinitätssäule mit 50 mM Tris/HCl-Puffer pH 7.4 möglich war[75]. Der Phosphorylase-Glykogenkomplex aus A. nidulans erwies sich demgegenüber als außerordentlich stabil. Eine Ablösung des Proteins war weder in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen bei verschiedenen pH-Werten, noch durch Waschen mit EDTA oder Maltodextrinlösungen möglich (vgl. 6.4.3.). Versuche, Glykogen enzymatisch abzubauen, führten zu einer Destabilisierung der Phosphorylase. Diese Befunde lassen erkennen, daß eine lockere Assoziation zwischen Enzym und Glykogen, wie sie vielfach beschrieben wurde, hier nicht besteht.

Auf der Grundlage der unter 6.3. und 6.4. geschilderten Experimente kann folgender Weg für den Abbau von Glykogen vorgeschlagen werden (Fig.26): zweifelsfrei verfügt der Organismus über eine Phosphorylase, die natives Glykogen als Substrat abbaut. Das Enzym liegt in vivo als stabiler Glykogen-Komplex vor. Ferner besteht Grund zu der Annahme, daß der Phosphorylase-Glykogenkomplex innerhalb der katabolen Sequenz an erster Stelle steht, da weitere, an der Mobilisierung beteiligte Enzyme zu Abbauprodukten des α-Glucans (Phosphorylase-Grenzdextrin) eine höhere Affinität besitzen als zu Glykogen selbst. Phosphorylase baut Glykogen nur zu 40 - 50 % ab; für

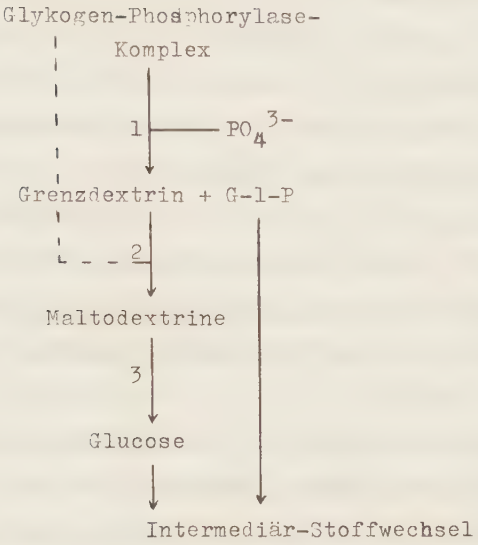


Fig. 26 : Hypothetischer Abbau von Glykogen in A. nidulans
(1) Glykogen-Phosphorylase
(2) Debranching enzyme
(3) α-Glucosidase

eine weitere Verwertung ist ein debranching enzyme notwendig, das beispielsweise in vitro aus einem Grenzdextrin durch Spaltung 1,6-α-glucosidischer Bindungen Maltotetraose freisetzt. Ein Vergleich mit bisher beschriebenen 1,6-α-Glucanohydrolasen zeigte eine Ähnlichkeit mit dem von Jeanningros et al. isolierten debranching enzyme aus E. coli[53]. Dieses Enzym zeigt hohe Affinität zu Phosphorylase-Grenzdextrin, ß-Amylase-Grenzdextrin, sowie verzweigten Oligosacchariden, während Glykogen nur sehr langsam hydrolysiert wird.

Der vollständige Abbau des α-Glucans kann schließlich durch eine α-Glucosidase gewährleistet werden, die verbleibende kurzkettige Maltodextrine als Substrat akzeptiert. Durch gemeinsame Einwirkung dieser drei Enzyme wird Glykogen vollständig zu Glucose-1-phosphat und Glucose abgebaut. Eine weitere Verwertung ist über den oxidativen Pentosephosphat-Zyklus möglich, dessen Existens in A. nidulans gesichert ist[6].

## 7.4. Glykogen-Phosphorylase - regulatorisches Enzym des α-Glucanabbaues in A. nidulans

Die durch Licht ausgelöste Aktivierung von Enzymen in A. nidulans, wie auch in Chloroplasten, ist wesentlich besser untersucht als das Phänomen der Dunkelaktivierung. Hypothesen zum Mechanismus der Lichtstimulation sind für Schlüsselenzyme des Calvin-Zyklus entwickelt worden[20]. Die Aktivität dieser Enzyme ist streng an die Anwesenheit von $Mg^{2+}$-Ionen gekoppelt. $Mg^{2+}$ wandert als Folge des lichtgetriebenen Elektronentrans-

portes im Austausch gegen $H^+$ vom Interlellarraum des Chloroplasten ins Stroma (Fig.2 a) und wirkt als Effektor auf Enzyme der $CO_2$-Fixierung[78]. Der kooperative Effekt des lichtabhängigen Ionenaustausches ist für gereinigte Fructose 1,6-bisphosphat-Phosphatase dokumentiert[79,80]. Zusätzlich zum Einfluß niedermolekularer Effektoren wurde für die Aktivierung von Schlüsselenzymen im Licht eine direkte photochemische Reduktion postuliert. Nach diesem Modell werden Elektronen von Ferredoxin über ein spezifisches Reduktasesystem auf Thioredoxin übertragen und reduziertes Thioredoxin aktiviert (= reduziert) regulatorische Enzyme[22]. Im Dunkeln wird eine Oxidation (= Desaktivierung) der Proteine mit oxidiertem Glutathion diskutiert (vgl. Fig.2 b), dessen Stoffwechsel in Chloroplasten nachgewiesen wurde[81]. Die photochemische Reduktion kann in vitro durch das (unphysiologische) Reduktionsmittel Dithiotreit (DTT) simuliert werden. Ein Anstieg der Enzymaktivität - ausgelöst durch Belichtung oder chemische Reduktion - wurde beschrieben für Fructose 1,6-bisphosphat-Phosphatase, Seduheptolose 1,6-bisphosphat-Phosphatase, NADP-abhängige Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, Ribulose-5-phosphat-Kinase[22,23], und NADP-abhängige Malat-Dehydrogenase[82].

Beispiele für eine Aktivierung von Enzymen im Dunkeln (Desaktivierung im Licht) beschränken sich bisher für A. nidulans wie für Chloroplasten auf Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase, das Schlüsselenzym des oxidativen Pentosephosphat-Zyklus[83]. Eine Proteinkomponente, die für dieses Phänomen verantwortlich sein könnte, wurde bisher nicht identifiziert. Hypothe-

tisch ist ein Mechanismus denkbar, nach dem die Aktivierung der Enzyme durch Oxidation, die Desaktivierung durch Reduktion erfolgt. Darüberhinaus beeinflussen niedermolekulare Effektoren die Aktivität der G-6-P-Dehydrogenase. Das Chloroplastenenzym wird durch die "reduction charge" ($NADP^+$/NADPH-Verhältnis) und die Konzentration von Ribulose-1,5-bisphosphat reguliert[84], während NADPH bei der Dehydrogenase aus A. nidulans einen Wechsel zu sigmoider Kinetik in Abhängigkeit vom pH bewirkt[85].

Die Resultate der unter 6.5. geschilderten Experimente zeigen, daß das Phänomen der Dunkelaktivierung auch für Glykogen-Phosphorylase zutrifft. Die Stimulierung der Enzymaktivität war durch Inhibitoren der Transkription und Translation (Rifampicin, Chloramphenicol) nicht hemmbar. Daraus läßt sich ableiten, daß für eine Aktivierung der Phosphorylase keine zusätzliche Proteinsynthese, sondern eine Überführung des Enzyms von einer wenig aktiven in eine aktive Form wahrscheinlich ist. Dieser Prozeß wird durch das Ausbleiben der Desaktivierung des Enzyms im Licht in Gegenwart von DCMU mit dem photosynthetischen Elektronentransport in Zusammenhang gebracht. Es sollte erwähnt werden, daß ein Teil der Experimente, in denen Inhibitoren eingesetzt wurden, im Widerspruch zu Resultaten steht, die von Singer und Doolittle beschrieben sind[86]. Diese Autoren fanden bei A. nidulans einen Anstieg der Phosphorylaseaktivität im Dunkeln, der jedoch durch Chloramphenicol hemmbar war. Eine Überprüfung dieser Aussage war indes nicht möglich, da die Arbeit keinen experimentellen Teil und keine Angaben über Kulturbedingungen oder Konzentration von Inhibitoren enthält.

Die Desaktivierung der Phosphorylase in vitro durch DTT ist an sich kein bemerkenswertes Resultat. Nimmt man jedoch die entsprechenden Kontrollexperimente hinzu, so zeigt sich, daß eine allgemeine Desaktivierung von Enzymen in Gegenwart von DTT ausgeschlossen werden kann. Die Aktivität von Isocitrat-Dehydrogenase läßt sich beispielsweise durch DTT nicht beeinflussen. Interessant ist die Beobachtung, daß Phosphorylase in vitro nur hemmbar war, wenn der Enzymkomplex aus Zellen isoliert wurde, die unter Lichtentzug kultiviert worden waren. Belichtete Zellen verfügen auch unter Bedingungen der Glykogensynthese über eine Phosphorylaseaktivität, die aber durch DTT nicht signifikant zu beeinflussen ist.

Die Ergebnisse der in vivo und in vitro Experimente lassen sich zusammengefaßt so interpretieren, daß Glykogen-Phosphorylase als regulatorisches Enzym der α-Glucanverwertung in A. nidulans betrachtet werden kann. Ein Vergleich der experimentellen Daten mit den oben diskutierten Hypothesen für die Licht/Dunkel-Regulation von Enzymen läßt eine Modulation der Phosphorylase durch chemische Modifikation erkennen, an der Redoxprozesse beteiligt sind. Die Aktivierung des Enzyms unter Bedingungen des Glykogenabbaues in der Zelle kann dabei durch Überführung (= Oxidation) von einer wenig aktiven in eine aktive Form erfolgen.

Die Frage nach dem biochemischen Signal, verantwortlich für die Umschaltung von Glykogenakkumulierung auf Mobilisierung, ist gleichtbedeutend mit der Identifizierung einer (oder mehrerer) Proteinkomponente(n), die eine Aktivierung bzw.

Desaktivierung der Phosphorylase bewirkt. Thioredoxin wurde in A. nidulans bisher nicht eindeutig nachgewiesen. Seine Beteiligung an der Desaktivierung der Phosphorylase im Licht kann deshalb nur aus Analogie zu Experimenten abgeleitet werden, bei denen eine Aktivierung von Enzymen in Gegenwart von Thioredoxin erfolgte[22]. Auch die unter 6.5.3. beschriebenen Versuche, Phosphorylase mit Thioredoxin aus Spinat zu desaktivieren, ergeben keine eindeutige Beteiligung dieses Reduktionsmittels an der Modulation der Phosphorylase.

Überträgt man spekulativ das Konzept der Licht/Dunkel-Regulation von Schlüsselenzymen auch auf den Bereich der Glykogensynthese in A. nidulans, so läßt sich vermuten, daß ADP-Glucose Pyrophosphorylase ebenfalls einer direkten Lichtregulation unterliegt. Dieses Enzym katalysiert den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der α-Glucansynthese in Bakterien und Pflanzen[87]. Die Regulation des α-Glucan-Stoffwechsels (Anabolismus und Katabolismus) könnte so auf einfache, aber effektive Weise durch den gleichen Mechanismus, jedoch mit entgegengesetzter Wirkung erfolgen.

8. Literaturzitate

1. Fott, B. (1971) Algenkunde. Fischer Verlag, Stuttgart.
2. Holm-Hansen, O. (1968) Ecology, physiology and biochemistry of blue-green algae. Ann. Rev. Microbiol. 22, 47-70.
3. Carr, N.G. und Whitton, B.A. eds. (1973) The biology of blue-green algae. Blackwell, London.
4. Wolk, C.P. (1973) Physiology and cytological chemistry of blue-green algae. Bact. Rev. 37, 32-101.
5. Stanier, R.Y., Kunisawa, R., Mandel, M. und Cohen-Bazire, G. (1971) Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales). Bact. Rev. 35, 171-205.
6. Pelroy, R.A., Rippka, R. und Stanier, R.Y. (1972) Metabolism of glucose by unicellular blue-green algae. Arch. Mikrobiol. 87, 303-322.
7. Ingram, L.O., van Baalen, C. und Calder, J.A. (1973) Role of reduced exogenous organic compounds in the physiology of the blue-green bacteria: photoheterotrophic growth of an "autotrophic" blue-green bacterium. J. Bacteriol. 114,701-705.
8. Ingram, L.O., Calder, J.A., van Baalen, C., Pfluckner, F.E. und Parker, P.L. (1973) Role of reduced organic compounds in the physiology of the blue-green bacteria: photoheterotrophic growth of an "heterotrophic" blue-green bacterium. J. Bacteriol. 114, 695-700.
9. Rippka, R. (1972) Photoheterotrophy and chemoheterotrophy among unicellular blue-green algae. Arch. Mikrobiol. 87,93-98.
10. Ihlenfeldt, M.J.A. und Gibson, J. (1975) Phosphate utilization and alkaline phosphatase activity in Anacystis nidulans. Arch. Mikrobiol. 102, 23-28.

11. Giesy, R.M. (1964) A light and electron microscope study of interlamellar polyglycosid bodies in Oscillatoria chalybia. Amer. J. Bot. 51, 388-396.

12. Chao, L. und Owen, J.C. (1971) Purification and properties of glycogen isolated from a blue-green algae, Nostoc muscorum. J. Bacteriol. 105, 331-338.

13. Weber, M. und Wöber, G. (1975) The fine structure of the branched α-glucan from the blue-green alga Anacystis nidulans: Comparison with other bacterial glycogens and phytoglycogen. Carbohydr. Res. 39, 295-302.

14. Dawes, E.A. und Ribbons, D.W. (1965) Studies on the endogenous metabolism of E. coli. Biochem. J. 95, 332-343.

15. Robinson, R.L. und Morris, J.G. (1974) Mobilization of granulose in Clostridium pasteurianum. Biochem. J. 144, 513-517.

16. Mackey, B.M. und Morris, J.G. (1974) Isolation of a mutant strain of Clostridium pasteurianum defective of granulose degradation. FEBS-Letters 48, 64-67.

17. Lehmann, M. und Wöber, G. (1976) Accumulation, mobilization and turn-over of glycogen in the blue-green bacterium Anacystis nidulans. Arch. Mikrobiol. 111, 93-97.

18. Doolittle, W.F. und Singer, R.A. (1974) Mutational analysis of dark endogenous metabolism in the blue-green bacterium Anacystis nidulans. J. Bact. 119, 677-683.

19. Urlaub, H. und Wöber, G. (1976) Characterization and metabolic activity of glycogen in Bacillus amyloliquefaciens. Microbios. Lett. 2, 179-187.

20. Walker, D.A. (1976) Regulatory mechanism in photosynthetic carbon metabolism. Curr. Top. Cell. Reg. 11, 203-241.

21. Barber, J. (1976) Cation control in photosynthesis. Trends in Biochemical Science 1, 33-36.

22. Wolosiuk, R.A. und Buchanan, B.B. (1977) Thioredoxin and glutathione regulate photosynthesis in chloroplasts. Nature (London) 266, 565-567.

23. Anderson, L.E. und Avron, M. (1976) Light modulation of enzyme aktivity in chloroplasts. Generation of membrane-bound vicinal-dithiol groups by photosynthetic electron transport. Plant Physiol. 57, 209-213.

24. Pempest, D.W. (1970) The continuous cultivation of micro-organisms: I. Theory of the chemostat. In: Methods of Microbiology. Eds. J.R. Norris und D.W. Ribbons, Vol. 2, pp. 259-276. Academic Press, London.

25. Thomas, J. (1973) Continuous cultivation of filamentous blue-green algae. In: The biology of blue-green algae. Eds. N.G. Carr und B.A. Whitton, pp. 531-535. Blackwell, London.

26. Schoch, T.J. (1957) Preparation of starch and the starch fractions. Methods Enzymol. 3, 11-12.

27. Pazur, J.H. und Ando, T. (1959) The action of an amylo-glucosidase of Aspergillus niger on starch and malto-oligosaccharides. J. Biol. Chem. 234, 1966-1970.

28. Bernfeld, P. (1955) α- and ß-amylases. Methods Enzymol. 1, 154-158.

29. Marshall, J.J. und Whelan, W.J. (1973) Removal of α-glucosidase impurity from cristalline sweet-potatoe ß-amylase. Anal. Biochem. 52, 642-646.

30. Gunja-Smith, Z., Marshall, J.J. und Smith, E.E. (1971) Enzymic determination of the unit chain length of glycogen and related polysaccharides.FEBS-Lett. 13, 309-311.

31. Palmer, T.N., Wöber, G. und Whelan, W.J. (1973) The pathway of exogenous and endogenous carbohydrate utilization in E. coli: A dual function for the enzymes of the maltose operon. Eur. J. Biochem. 39, 601-612.

32. Fischer, E.H. und Stein, E.A. (1961) α-Amylase from human saliva. Biochem. Präp. 8, 27-33.

33. Agrawal, B.L.L. und Goldstein, I.J. (1972) Concanavalin A, the Jack Bean (Canavalia ensiformis) phytohemagglutinin. Methods Enzymol. 28, 313-318.

34. Fischer, E.H. und Krebs, E.G. (1958) The isolation and cristallization of rabbit skeletal muscle phosphorylase b. J. Biol. Chem. 231, 65-71.

35. Taylor, C., Cox, A.J., Kernohan, J.C. und Cohen, P. (1975) Debranching enzyme from rabbit skeletal muscle. Eur. J. Biochem. 51, 105-115.

36. French, D., Pulley, A.P., Abdullah, M. und Linden, J.C. (1966) Two-dimensional paper chromatography interspersed with reaktion on the paper. J. Chromat. 24, 271-276.

37. Trevelyan, W.E., Procter, D.P. und Harrison, J.S. (1950) Detection of sugars on paper chromatograms. Nature (London) 166, 444-445.

38. Tagaaki, T.H., Toda, H. und Isumura, T. (1971) Bacterial and mold amylases. In: The Enzymes. Ed. P.D. Boyer, Vol. 5, pp. 235-271.

39. Urlaub, H. und Wöber, G. (1975) The metabolic role of debranching enzymes. Biochem. Soc. Trans. 3, 53-56.

40. Nelson, J. (1944) A photometric adaption of the Somogy-method for the determination of glucose. J. Biol. Chem. 153, 375-380.

41. Hedrick, J.L. und Fischer, E.H. (1965) On the role of pyridoxal-5'-phosphat in phosphorylase. I. Absence of classical vitamin $B_6$-dependent enzymatic activities in muscle glycogen phosphorylase. Biochemistry 4, 1337-1343.

42. Norrman, J. und Wöber, G. (1975) Comparative biochemistry of α-glucan utilization in Pseudomonas amyloderamosa and Pseudomonas saccharophila. Physiological significance of variations in the pathways. Arch. Mikrobiol. 102, 253-260.

43. Cleland, W.W., Thompson, V.W. und Barden, R.E.(1969) Isocitrat dehydrogenase (TPN-specific) from pig heart. Methods Enzymol. 13, 30-33.

44. Arnon, D.I. (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in Beta vulgaris. Plant. Physiol. 24, 1-15.

45. Steensland, H. (1973) Continuous cultivation of a sewage fungus Fusarium aquaeductuum. Arch. Mikrobiol. 93, 287-294.

46. Caras, M.J. (1950) Phenoldisulfonic acid method of determing nitrate in water. Anal. Chem. 22, 1020-1022.

47. Lowry, O.H., Roseborough, N.J., Farr, A.L. und Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275.

48. Marshall, J.J. und Whelan, W.J. (1970) Incomplete conversion of glycogen and starch by cristalline amyloglucosidase. FEBS-Lett. 9, 85-88.

49. March, S.C., Parikh, I. und Cuatrecasas, P. (1974) A simplified method for cyanogen bromid activation for affinity chromatography. Anal. Biochem. 60, 149-152.

50. Kratz, W.A. und Myers, J. (1955) Nutrition and growth of several blue-green algae. Am. J. Bot. 42, 282-287.

51. Sugimoto, T., Amemura, A. und Harada, T. (1974) Formations of extracellular isoamylase and intracellular α-glucosidase amylase(s) by Pseudomonas SB 15 and a mutant strain. Applied Mikrobiol. 28, 336-339.

52. Gunja-Smith, Z., Marshall, J.J., Smith, E.E. und Whelan, W.J. (1970) A glycogen debranching enzyme from Cytophaga. FEBS-Lett. 12, 96-100.

53. Jenningros, R., Creuzet-Sigal, N., Frixon, C. und Cattaneo, J. (1976) Purification and properties of a debranching enzyme from E. coli. Biochim. Biophys. Acta 438, 186-199.

54. Liebster, J., Kopoldová, J., Kozel, J. und Dobiášová, M. (1961) Darstellung unspezifisch markierter Verbindungen durch Biosynthese. Coll. Czech. Chem. Comm. 26, 1582-1589.

55. Putman, E.W., Hassid, W.Z., Krotkov, G. und Barker, H.A. (1948) Preparation of radioactive carbon-labelled sugars by photosynthesis. J. Biol. Chem. 173, 785-795.

56. Dubbs, C.A. (1949) Improved apparatus for radiobiological synthesis. Science 109, 571-572.

57. Bean, R.C. und Hassid, W.Z. (1955) Accumulation of $^{14}CO_2$ by a photosynthesizing red algae, Iriophycus Flaccidum. J. Biol. Chem. 212, 411-425.

58. Tovey, K.C., Spiller, G.H., Oldham, K.G., Lucas, N. und Carr, N.G. (1974) A new method for the preparation of (U-$^{14}$C)-labelled compounds by using Anacystis nidulans. Biochem. J. 142, 47-56.

59. Donnelly, E.H. und Goldstein, I.J. (1970) Glutaraldehyde-insolubilized Concanavalin A: an adsorbent for the specific isolation of polysaccharides and glycoproteins. Biochem. J. 118, 679-680.

60. Dutton, R.W. und Dalgliesh, C.E. (1956) An apparatus for preparative photosynthesis of $^{14}C$-labelled substances. J. Chem. Soc. 3792-3796.

61. Wacker, A., Träger, L. und Büttner, H. (1962) Eine einfache Methode zur Gewinnung $^{14}C$-markierter Verbindungen aus Algen. Naturwissenschaften 49, 518.

62. Prokop, A., Ričica, J., Málek, I. und Thomas, J. (1967) Growth and physiological characteristics of a high temperature strain of Chlorella pyrenoidosa in continuous culture. Nature 214, 1234-1235.

63. Thomas, J. und David, K.A.V. (1971) Studies on the physiology of heterocyst production in the nitrogen-fixing blue-green alga Anabena sp. L-31 in continuous culture. J. Gen. Microbiol. 66, 127-131.

64. Bone, D.H. (1971) Nitrogenase activity and nitrogen assimilation in Anabena flos-aquae growing in continuous culture. Arch. Mikrobiol. 80, 234-241.

65. Gemerden, H. van und Jannasch, H.W. (1971) Continuous culture of Thiorhodaceae. Arch. Mikrobiol. 79, 345-353.

66. Lehmann, M. (1975) Akkumlierung, Mobilisierung und Turnover von Glykogen in dem blau-grünen Bakterium Anacystis nidulans. Diplomarbeit, Marburg.

67. Carr, N.G. und Mann, N. (1975) Nucleic acid synthesis and regulation in the blue-green algae. Biochem. Soc. Trans. 3, 368-373.

68. Slater, J.H. (1975) The control of $CO_2$ assimilation and ribulose-1,5-diphosphat carboxylase activity in Anacystis nidulans grown in a light-limited chemostat. Arch. Mikrobiol. 103, 45-49.

69. Jüttner, F., Victor, H. und Metzner, H. (1971) Massenanzucht phototropher Organismen in einer automatischen Kulturanlage. Arch. Mikrobiol. 77, 275-280.

70. Chen, G.S. und Segel, I.H. (1968) Purification and properties of glycogen phosphorylase from E. coli. Arch. Biochem. Biophys. 127, 175-186.

71. Lee, E.Y.C. und Braun, J.J. (1973) Sweet corn phosphorylase: Purification and properties. Arch. Biochem. Biophys. 156, 276-286.

72. Ariki, M. und Fukui, T. (1975) α-Glucan phosphorylase from sweet potatoe: Isolation and properties of the partially degradated enzyme. Biochim. Biophys. Acta 386, 301-308.

73. Burr, B. und Nelson, O.E. (1975) Maize α-glucan phosphorylase. Eur. J. Biochem. 56, 539-546.

74. Fosset, M., Muir, L.W., Nielsen, L.D. und Fischer, E.H. (1971) Purification and properties of yeast glycogen phosphorylase a and b. Biochemistry 10, 4105-4113.

75. Sørensen, N.B. und Wang, P. (1975) Purification of glycogen phosphorylase by affinity chromatography on 5'-AMP-Sepharose. Biochem. Biophys. Res. Comm. 67, 883-887.

76. Killilea, S.D. und Whelan, W.J. (1976) Purification and properties of rabbit-liver glycogen synthase. Biochemistry 15, 1349-1356.

77. Matheson, N.K. und Richardson, R.H. (1976) Starch phosphorylase enzymes in developing and germinating pea seeds. Phytochemistry 15, 887-892.

78. Werdan, K., Heldt, H.W. und Milovancev, M. (1975) The role of pH in the regulation of carbon fixation in the chloroplast stroma. Studies on $CO_2$ fixation in the light and in the dark. Biochim. Biophys. Acta 396, 276-292.

79. Baier, D. und Latzko, E. (1975) Properties and regulation of C-1-fructose-1,6-diphosphatase from spinach chloroplasts. Biochim. Biophys. Acta 396, 141-148.

80. Zimmermann, G., Kelly, G.J. und Latzko, E. (1976) Efficient purification and molecular properties of spinach fructose 1,6-bisphosphatase. Eur. J. Biochem. 70, 361-367.

81. Schaedle, M. und Bassham, J.A. (1977) Chloroplast glutathion reductase. Plant Physiol. 59, 1011-1012.

82. Jacquot, J.P., Vidal, J. und Gadal, P. (1976) Identification of a protein factor involved in DTT activation of NADP malate dehydrogenase from french bean leaves. FEBS-Lett. 71, 223-227.

83. Duggan, J.X. und Anderson, L.E. (1975) Light regulation of enzyme activity in A. nidulans. Planta 122, 293-297.

84. Wildner, G.F. (1975) The regulation of G-6-P dehydrogenase in chloroplasts. Zeitschrift für Naturforschung 30c, 756-760.

85. Grossman, A. und McGowan, R.E. (1975) Regulation of G-6-P dehydrogenase in blue-green algae. Plant Physiol. 55, 658-662.

86. Singer, R.A. und Doolittle, W.F. (1975) Control of gene expression in the blue-green algae. Nature 253, 650-651.

87. Preiss, J. (1969) The regulation of the biosynthesis of α-glucans in bacteria and plants. Curr. Top. Cell. Reg. 1, 125-160.

Die vorliegende Arbeit wurde von August 1975 bis Dezember 1977 im Fachgebiet Biochemie am Fachbereich Chemie durchgeführt.

Herrn Dozent Dr. G. Wöber
danke ich für die Anregung zu der vorliegenden Arbeit, für sein reges Interesse und seine wertvollen Ratschläge.

## Lebenslauf

| | |
|---|---|
| Name: | Martin Lehmann |
| Geburtsdatum: | 12. 5. 1949 |
| Geburtsort: | Haldensleben / Magdeburg |
| Eltern: | Lehrer Herbert Lehmann<br>und Käthe Lehmann, geb. Herzmann<br>Korrespondentin |
| 1955 - 1960 | Volksschule Bovenden / Göttingen |
| 1960 - 1962 | Goethe-Gymnasium Wetzlar |
| 1962 - 1968 | Gymnasium Homberg / Efze (Abitur) |
| 1968 - 1969 | Grundwehrdienst Marburg |
| Oktober 1969 | Immatrikulation an der Universität Marburg |
| Wintersemester 1971 | Vordiplomprüfung in Chemie |
| Mai 1974 | Hauptdiplomprüfung in Chemie |
| seit Juli 1974 | Anfertigung der Diplomarbeit unter Anleitung von Herrn Dozent Dr. G. Wöber |
| seit August 1975 | Anfertigung der Doktorarbeit unter Anleitung von Herrn Dr. G. Wöber |
| seit November 1975 | Tätigkeit als wissenschaftlicher Assistent |
| seit Oktober 1976 | Tätigkeit als akademischer Tutor |
| seit März 1977 | Tätigkeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter |